

Studien zur Identifizierung & Optimierung potentieller Wirkstoffe für die Behandlung von Morbus Alzheimer

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Lebensmittelchemiker Gregor Larbig
aus Hanau

Berichterstatter:	Prof. Boris Schmidt
Mitberichterstatter:	Prof. Harald Kolmar
Tag der Einreichung:	26. Februar 2007
Tag der mündlichen Prüfung:	16. April 2007

Darmstadt 2007

D17

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt von April 2003 bis Juli 2006 angefertigt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Boris Schmidt danke ich recht herzlich für die interessante und vielseitige Themenstellung, die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinem Laborkollegen Hannes Braun für das ausgezeichnete Laborklima sowie seiner steten Hilfsbereitschaft,
- den übrigen Mitgliedern des Arbeitskreises Stefanie Baumann, Frau Keenan, Daniel Kieser, Raj Narlawar, Mahesh Shiorkar, Ali Taghavi und Sumaira Umbreen für die nette Zusammenarbeit,
- den ehemaligen Kollegen Behrouz Yousefi, Heidelore Freter, Jödis Bott, Daniela Meid und Luiz Everson da Silva,
- Dr. Marcus Pickhardt vom Max Planck Institut in Hamburg für die Bestimmung der Aktivitäten vieler Tau-Inhibitoren und die Durchführung des LDH-Asaays,
- Dr. Manfred Brockhaus von der Firma Hoffmann-La Roche für die Messung der zahlreichen Tetron- und Tetramsäuren,
- Dr. Martin Urban für die gute Zusammenarbeit und seine stete Hilfsbereitschaft bei der Betreuung verschiedener Praktika,
- Dr. David G. Lloyd vom Trinity College Dublin für die tatkräftige Unterstützung bei der Einführung in das Gebiet des Molecular Modellings,
- meinem Praktikanten Lars Weyrauch für die Bearbeitung des GSK3 β -Projektes, sowie Andrea Zall für die Synthese verschiedener γ -Sekretase-Inhibitoren,
- Verena Reeg für die gewissenhafte Korrekturen,
- Prof. Kolmar für die freundliche Übernahme der Mitberichterstattung.

Vor allem danke ich meinem "Privatkoch" Olli und Bettina für das entgegengebrachte Verständnis und ihre großartige Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- G. Larbig, M. Pickhardt, D. G. Lloyd, B. Schmidt, E. Mandelkow "Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: A ligand based approach results in succesful scaffold hopping" *Curr. Alz. Research* **2007**, *im Druck*
- **EP Appl. 2006**, Anmeldung 5.11.2006 B. Schmidt, G. Larbig, D. G. Lloyd, M. Pickhardt, E. Mandelkow.
- G. Larbig, B. Schmidt "A facile synthesis of tetramic and tetronic acids as β -Secretase inhibitors" *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490.
- B. Schmidt, S. Baumann, R. Narlawar, H. A. Braun, G. Larbig "Modulators & Inhibitors of β - and γ - Secretase" *Neurodegen. Dis.* **2006**, 3, 290 - 297.
- B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig "Inhibitors and Modulators for β - and γ - Secretase" *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6(4), 377-392.
- G. Larbig, A. Zall, B. Schmidt "Inhibitors designed for Presenilin 1 by means of aspartic acid activation" *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 2334-2340.

Inhaltsverzeichnis

1 DIE ALZHEIMERSCHE KRANKHEIT	1
1.1 Epidemiologie der Alzheimerschen Krankheit	2
1.2 Merkmale von Morbus Alzheimer	3
1.3 Risikofaktoren	5
1.4 Etablierte Therapieformen und neue Ansätze	6
1.5 Molekulare Grundlagen der Alzheimerschen Krankheit	9
1.5.1 Der APP-Metabolismus	9
1.5.2 Aspartylproteasen	13
1.5.2.1 Die β -Sekretase (BACE)	16
1.5.2.1.1 β -Sekretase-Inhibitoren	18
1.5.2.2 Die γ -Sekretase	22
1.5.2.2.1 γ -Sekretase-Inhibitoren	24
1.5.3 Das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau	27
1.5.3.1 Die Bedeutung der Phosphorylierung	29
1.5.3.2 Tau-Aggregation <i>in vitro</i>	30
1.5.3.3 Tau-Aggregation <i>in vivo</i>	33
1.6 Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)	34
1.6.1 Die Rolle von GSK3 β in der Pathologie der Alzheimer-Demenz	36
1.6.2 Oxidativer Stress, Calcium-Homöostase und Zelltod	38
2 WIRKSTOFFDESIGN	41
2.1 Die Stärke von Protein-Liganden-Interaktionen (IC_{50}, K_i)	42
2.2 Faktoren, die die Bindungsaffinität von Protein-Liganden-Komplexen bestimmen	45
2.2.1 Elektrostatische Wechselwirkungen	45
2.2.2 Beiträge durch Solvation und Desolvation	47
2.3 Auffinden und Optimierung einer Leitstruktur	49
2.4 Pharmakokinetik	50
3 PROBLEM- UND AUFGABENSTELLUNG	53
4 TETRAM- UND TETRONSÄUREN ALS β-SEKRETASE-INHIBITOREN	56
4.1 Einleitung	56

4.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen	57
4.2.1 Synthese der Tetramsäuren 43-85	60
4.2.2 Synthese der Tetronsäuren 95-100	65
4.2.3 Synthese der <i>N</i> -substituierten Tetramsäuren 110-124	67
4.2.4 Synthese der Sulfotetramsäuren 131 und 132	70
4.3 Biologische Aktivität & Struktur-Aktivitätsbeziehungen	72
4.4 Schlussfolgerung & Ausblick	76
 5 DESIGN VON PRESENILIN1-INHIBITOREN DURCH ASPARAGINSÄUREAKTIVIERUNG	 79
5.1 Einleitung	79
5.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen	80
5.3 Synthese	84
5.4 Biologische Aktivität & Inhibitoreigenschaften	89
 6 SYNTHESE EINES MEMBRANUNDURCHLÄSSIGEN γ-SEKRETASE-INHIBITORS	 91
6.1 Einleitung	91
6.2 Synthesepan	92
6.3 Synthese	94
6.4 Biologische Aktivität & Ausblick	95
 7 POTENTIAL VON GSK3-INHIBITOREN IN DER THERAPIE VON MORBUS ALZHEIMER	 96
7.1 Einleitung	96
7.2 Allgemeine Überlegungen, Synthesepan	97
7.3 Synthese	98
7.4 Biologische Aktivität	100
7.4.1 Einfluss auf die A β -Aktivität	100
7.4.2 Einfluss auf die Tau-Phosphorylierung	102
7.4.2.1 N2a-Tau4R-EGFP-Zellassay	102
7.4.2.2 Hefe-Zellassay	103
7.5 Zusammenfassung & Ausblick	104

8 LIGANDENBASIERTES VIRTUELLES SCREENING: SUCHE NACH NEUEN LEITSTRUKTUREN FÜR DIE INHIBITION DER TAU-AGGREGATION	107
8.1 Einleitung	107
8.2 Erzeugung der pharmakophoren Modelle und virtuelles Screening mit CATALYST®	108
8.3 Algorithmen in CATALYST®	112
8.3.1 Konformationsanalyse	112
8.3.1.1 Der Poling-Algorithmus	116
8.3.2 Der HypoGen-Algorithmus	119
8.4 Ergebnisse & Diskussion des virtuellen Screenings	123
8.5 Zusammenfassung & Ausblick	128
9 SYNTHESE VON TAU-AGGREGATIONS- UND DEPOLYMERISATIONS-INHIBITOREN	131
9.1 Einleitung	131
9.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen	133
9.3 Synthese	135
9.3.1 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 294-324	135
9.3.2 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 332-341	138
9.3.3 Synthese der Substanzen 346/347	139
9.3.4 Synthese der Substanzen 350/351	141
9.3.5 Synthese der Substanzen 357/358	142
9.3.6 Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides 364	144
9.3.7 Synthese der Verbindung 370	145
9.3.8 Synthese der Verbindung 375	146
9.3.9 Synthese der Benzothiazole 387-393	147
9.4 Biologische Aktivität	149
9.4.1 Aktivitäten der Phenylthiazolhydrazid-Derivate	149
9.4.2 Aktivitäten der Benzothiazole 387-393	154
9.5 Zusammenfassung & Ausblick	154
10 ZUSAMMENFASSUNG	158
10.1 Die molekularen Zusammenhänge von Morbus Alzheimer	158
10.2 Tetron- und Tetramsäuren als BACE-Inhibitoren	159
10.3 γ -Sekretase-Inhibitoren	160

10.4 Inhibition von GSK3β	161
10.5 Tau-Inhibitoren	162
11 EXPERIMENTELLER TEIL	163
11.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen und Analysegeräte	163
11.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Bromacetamide	165
11.2.1 Herstellung von <i>N</i> -Benzyl-2-bromacetamid 86	165
11.2.2 Herstellung von <i>N</i> -Benzyl-2-bromacetamid 87	165
11.2.3 Herstellung von 2-Bromacetamid 88	166
11.2.4 Herstellung von 2-Brom- <i>N</i> -isobutylacetamid (89)	166
11.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thioessigsäure-Derivate 30/31, 33-41	166
11.3.1 Herstellung von 2-(3-(Trifluormethyl)benzyl)thioessigsäure (30)	167
11.3.2 Herstellung von 2-(Phenethyl)thioessigsäure (31)	167
11.3.3 Herstellung von 2-((Benzylcarbamoyl)methyl)thioessigsäure (33)	168
11.3.4 Herstellung von 2-((Phenylethylcarbamoyl)methyl)-thioessigsäure (34)	168
11.3.5 Herstellung von 2-((Furan-2-yl)methyl)thioessigsäure (35)	169
11.3.6 Herstellung von 2-((Benz[<i>d</i>][1,3]dioxol-6-yl)methyl)-thioessigsäure (36)	169
11.3.7 Herstellung von 2-((Isobutylcarbamoyl)methyl)thioessigsäure (37)	170
11.3.8 Herstellung von 2-(4-Fluorbenzyl)thioessigsäure (38)	170
11.3.9 Herstellung von 2-(3-Methoxybenzyl)thioessigsäure (39)	171
11.3.10 Herstellung von 2-(3-Trifluormethoxybenzyl)thioessigsäure (40)	171
11.3.11 Herstellung von 2-(3-Cyanbenzyl)thioessigsäure (41)	172
11.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Tetramsäuren 43-85	172
11.4.1 Herstellung von Tetramsäure 43	173
11.4.2 Herstellung von Tetramsäure 44	174
11.4.3 Herstellung von Tetramsäure 45	174
11.4.4 Herstellung von Tetramsäure 46	175
11.4.5 Herstellung von Tetramsäure 47	176
11.4.6 Herstellung von Tetramsäure 48	176
11.4.7 Herstellung von Tetramsäure 49	177
11.4.8 Herstellung von Tetramsäure 50	177
11.4.9 Herstellung von Tetramsäure 51	178
11.4.10 Herstellung von Tetramsäure 52	178
11.4.11 Herstellung von Tetramsäure 53	179
11.4.12 Herstellung von Tetramsäure 54	179
11.4.13 Herstellung von Tetramsäure 55	180
11.4.14 Herstellung von Tetramsäure 56	181
11.4.15 Herstellung von Tetramsäure 57	182
11.4.16 Herstellung von Tetramsäure 58	182
11.4.17 Herstellung von Tetramsäure 59	183
11.4.18 Herstellung von Tetramsäure 60	184
11.4.19 Herstellung von Tetramsäure 61	184
11.4.20 Herstellung von Tetramsäure 62	185
11.4.21 Herstellung von Tetramsäure 63	185
11.4.22 Herstellung von Tetramsäure 64	186

11.4.23 Herstellung von Tetransäure	65	186
11.4.24 Herstellung von Tetransäure	66	187
11.4.25 Herstellung von Tetransäure	67	187
11.4.26 Herstellung von Tetransäure	68	188
11.4.27 Herstellung von Tetransäure	69	189
11.4.28 Herstellung von Tetransäure	70	190
11.4.29 Herstellung von Tetransäure	71	190
11.4.30 Herstellung von Tetransäure	72	191
11.4.31 Herstellung von Tetransäure	73	192
11.4.32 Herstellung von Tetransäure	74	192
11.4.33 Herstellung von Tetransäure	75	193
11.4.34 Herstellung von Tetransäure	76	193
11.4.35 Herstellung von Tetransäure	77	194
11.4.36 Herstellung von Tetransäure	78	194
11.4.37 Herstellung von Tetransäure	79	195
11.4.38 Herstellung von Tetransäure	80	195
11.4.39 Herstellung von Tetransäure	81	196
11.4.40 Herstellung von Tetransäure	82	197
11.4.41 Herstellung von Tetransäure	83	197
11.4.42 Herstellung von Tetransäure	84	198
11.4.43 Herstellung von Tetransäure	85	199
11.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Tetronsäuren	95-100	199
11.5.1 Herstellung von Tetronsäure	95	200
11.5.2 Herstellung von Tetronsäure	96	200
11.5.3 Herstellung von Tetronsäure	97	201
11.5.4 Herstellung von Tetronsäure	98	201
11.5.5 Herstellung von Tetronsäure	99	202
11.5.6 Herstellung von Tetronsäure	100	203
11.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der N-substituierten Tetransäuren	110-124	203
11.6.1 Herstellung von Tetransäure	110	204
11.6.2 Herstellung von Tetransäure	111	205
11.6.3 Herstellung von Tetransäure	112	205
11.6.4 Herstellung von Tetransäure	113	206
11.6.5 Herstellung von Tetransäure	114	207
11.6.6 Herstellung von Tetransäure	115	207
11.6.7 Herstellung von Tetransäure	116	208
11.6.8 Herstellung von Tetransäure	117	208
11.6.9 Herstellung von Tetransäure	118	209
11.6.10 Herstellung von Tetransäure	119	209
11.6.11 Herstellung von Tetransäure	120	210
11.6.12 Herstellung von Tetransäure	121	210
11.6.13 Herstellung von Tetransäure	122	211
11.6.14 Herstellung von Tetransäure	123	211
11.6.15 Herstellung von Tetransäure	124	212
11.7 Synthese der Sulfotetransäuren	131 und 132	212
11.7.1 Herstellung von <i>H</i> -Leu-OBzl- <i>p</i> -tosylat (127)		212
11.7.2 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(trifluormethyl)benzylthio)-acetamid)-4-methylpentanoat (128)		213

11.7.3 Oxidation von 128 mit <i>m</i> CPBA	214
11.7.3.1 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(Trifluormethyl)-benzylsulfinyl)-acetamid)-4-methylpentanoat (129)	214
11.7.3.2 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(Trifluormethyl)-benzylsulfonyl)-acetamid)-4-methylpentanoat (130)	215
11.7.4 Herstellung von Sulfotetramsäure 131	215
11.7.5 Herstellung von Sulfotetramsäure 132	216
11.8 Synthese von DiazoDAPT 144	217
11.8.1 Herstellung von Z-Gly-Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (146)	217
11.8.2 Herstellung von Gly-Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (147)	218
11.8.3 Herstellung von DiazoDAPT (144)	218
11.9 Synthese von DAPT (13)	219
11.9.1 Herstellung von Z-Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (157)	219
11.9.2 Herstellung von Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (158)	220
11.9.3 Herstellung von DAPT (13)	221
11.10 Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate 149-153	221
11.10.1 Herstellung von DAPA (160)	221
11.10.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate 149-153	222
11.10.2.1 Herstellung von (S)-1-Cyclopropylethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (149)	223
11.10.2.2 Herstellung von (S)-Cyclopropylmethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (150)	223
11.10.2.3 Herstellung von (S)-Dicyclopropylmethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (151)	224
11.10.2.4 Herstellung von (2S)-N-((S)-(Cyclopropyl-methyl-carbamoyl)-phenylmethyl)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid (152)	224
11.10.2.5 Herstellung von (S)-Cyclopropyl-(phenylmethyl)-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (153)	225
11.11 Alternative Synthese des am C-Terminus veränderten DAPT-Derivats 226	226
11.11.1 Herstellung von <i>tert</i> -Butyl-(S)-(cyclopropylmethyl-carbamoyl)-(phenyl)-methylcarbammat (167)	226
11.11.2 Herstellung von (S)-2-Amino-N-(cyclopropylmethyl)-2-phenylacetamid (168)	227
11.11.3 Herstellung von Benzyl-(S)-1-((S)-(cyclopropylmethyl-carbamoyl)-(phenyl)methylcarbamoyl)ethylcarbammat (154)	227
11.11.4 Herstellung von (2S)-N-((S)-(Cyclopropylmethylcarbamoyl)-(phenyl)methyl)-2-aminopropanamid (169)	228
11.12 Synthese der γ-Sekretase-Inhibitoren 170 und 171	228
11.12.1 Herstellung von Pyridin-3-essigsäure-Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (172)	228
11.12.2 Herstellung von 5-Brompyridin-3-essigsäure-Ala-Phg-O(<i>t</i> -Bu) (173)	229
11.12.3 Herstellung von Verbindung 170	229
11.12.4 Herstellung von Verbindung 171	230
11.13 Synthese der potentiellen GSK3-Inhibitoren 180-191, 200-203	231
11.13.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Substanzen 180-191	231
11.13.1.1 Herstellung von Harnstoffderivat 180	231

11.13.1.2 Herstellung von Harnstoffderivat	181	232
11.13.1.3 Herstellung von Harnstoffderivat	182	232
11.13.1.4 Herstellung von Harnstoffderivat	183	233
11.13.1.5 Herstellung von Harnstoffderivat	184	234
11.13.1.6 Herstellung von Harnstoffderivat	185	234
11.13.1.7 Herstellung von Harnstoffderivat	186	235
11.13.1.8 Herstellung von Harnstoffderivat	187	236
11.13.1.9 Herstellung von Harnstoffderivat	188	236
11.13.1.10 Herstellung von Harnstoffderivat	189	237
11.13.1.11 Herstellung von Harnstoffderivat	190	237
11.13.1.12 Herstellung von Harnstoffderivat	191	238
11.13.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Verbindungen	194–197	239
11.13.2.1 Herstellung von 4-(4-Methoxyphenyl)thiazol-2-amin (194)		239
11.13.2.2 Herstellung von 3-(2-Aminothiazol-4-yl)-2 <i>H</i> -chromen-2-on (195)		239
11.13.2.3 Herstellung von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-amin (196)		240
11.13.2.4 Herstellung von 4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin (197)		240
11.13.3.1 Herstellung von Harnstoffderivat	200	240
11.13.3.2 Herstellung von Harnstoffderivat	201	241
11.13.3.3 Herstellung von Harnstoffderivat	202	242
11.13.3.4 Herstellung von Harnstoffderivat	203	242
11.14 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide	294–324	243
11.14.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Carbonsäurechloride	273–279	243
11.14.1.1 Herstellung von Nicotinoylchlorid-Hydrochlorid (273)		243
11.14.1.2 Herstellung von Biphenylcarbonsäurechlorid (274)		244
11.14.1.3 Herstellung von 2-Naphthoylchlorid (275)		244
11.14.1.4 Herstellung von Benz[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-carbonsäurechlorid (276)		244
11.14.1.5 Herstellung von 2-Oxo-2 <i>H</i> -chromen-3-carbonsäurechlorid (277)		245
11.14.1.6 Herstellung von 1 <i>H</i> -Benz[<i>d</i>]imidazol-5-carbonsäurechlorid (278)		245
11.14.1.7 Herstellung von 1 <i>H</i> -Indol-2-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid (279)		245
11.14.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide	281–284	246
11.14.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide	280, 285, 286	246
11.14.4 Herstellung von Thiosemicarbazid	280	246
11.14.5 Herstellung von Thiosemicarbazid	281	247
11.14.6 Herstellung von Thiosemicarbazid	282	247
11.14.7 Herstellung von Thiosemicarbazid	283	247
11.14.8 Herstellung von Thiosemicarbazid	284	248
11.14.9 Herstellung von Thiosemicarbazid	285	248
11.14.10 Herstellung von Thiosemicarbazid	286	248
11.14.11 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide	294–324	249
11.14.11.1 Herstellung von <i>N'</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)nicotinhydrazid (294)		249
11.14.11.2 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	295	250
11.14.11.3 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	296	250
11.14.11.4 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	297	251
11.14.11.5 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	298	251

11.14.11.6 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	299	252
11.14.11.7 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	300	252
11.14.11.8 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	301	253
11.14.11.9 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	302	253
11.14.11.10 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	303	254
11.14.11.11 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	304	255
11.14.11.12 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	305	255
11.14.11.13 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	306	256
11.14.11.14 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	307	256
11.14.11.15 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	308	257
11.14.11.16 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	309	257
11.14.11.17 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	310	258
11.14.11.18 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	311	259
11.14.11.19 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	312	259
11.14.11.20 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	313	260
11.14.11.21 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	314	260
11.14.11.22 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	315	261
11.14.11.23 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	316	261
11.14.11.24 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	317	262
11.14.11.25 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	318	262
11.14.11.26 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	319	263
11.14.11.27 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	320	263
11.14.11.28 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	321	264
11.14.11.29 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	322	264
11.14.11.30 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	323	265
11.14.11.31 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	324	265
11.15 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide	332-341	265
11.15.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide	328–330	265
11.15.1.1 Herstellung von Thiosemicarbazid	328	266
11.15.1.2 Herstellung von Thiosemicarbazid	329	266
11.15.1.3 Herstellung von Thiosemicarbazid	330	266
11.15.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide	332–341	267
11.15.2.1 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	332	267
11.15.2.2 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	333	268
11.15.2.3 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	334	268
11.15.2.4 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	335	269
11.15.2.5 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	336	269
11.15.2.6 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	337	270
11.15.2.7 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	338	270
11.15.2.8 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	339	271
11.15.2.9 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	340	272
11.15.2.10 Herstellung von Phenylthiazolbenzyhdrazid	341	272
11.16 Synthese der Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid	346/347	273
11.16.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide	344/345	273
11.16.1.1 Herstellung von Thiosemicarbazid	344	273
11.16.1.2 Herstellung von Thiosemicarbazid	345	273

11.16.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid 346/347	274
11.16.2.1 Herstellung von Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid 346	274
11.16.2.2 Herstellung von Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid 347	275
11.17 Synthese der Semicarbazide 350/351	275
11.17.1 Herstellung von Thiosemicarbazid 349	275
11.17.2 Herstellung von Phenylsemicarbazid 350	276
11.17.3 Herstellung von Phenylsemicarbazid 351	277
11.18 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 357/358	277
11.18.1 Herstellung von 1-(4-Morpholinphenyl)ethanon (354)	277
11.18.2 Herstellung von 2,2-Dibrom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon (355)	278
11.18.3 Herstellung von 2-Brom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon (356)	279
11.18.4 Herstellung von Phenylthiazolbenzhydrazid 357	279
11.18.5 Herstellung von Phenylthiazolbenzhydrazid 358	280
11.19 Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides 364	280
11.19.1 Herstellung von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäure (361)	280
11.19.2 Herstellung von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäurechlorid-Hydrochlorid (362)	281
11.19.3 Herstellung von Thiosemicarbazid 363	282
11.19.4 Herstellung Phenylthiazolbenzhydrazid 364	282
11.20 Synthese des Thiazols 370	283
11.20.1 Herstellung von Ethyl-4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-carboxylat (367)	283
11.20.2 Herstellung von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-carbhydrazid (368)	284
11.20.3 Herstellung von Thiazol 369	284
11.20.4 Herstellung von 2-(4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-yl)-5-(4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadiazol (370)	285
11.21 Synthese des Oxadiazols 375	286
11.21.1 Herstellung von Methyl-2-(4-fluorbenzamid)acetat (372)	286
11.21.2 Herstellung von 2-(4-Fluorbenzamid)acethydrazid (373)	286
11.21.3 Herstellung von Hydrazid 374	287
11.21.4 Herstellung von 4-Fluor- <i>N</i> -((4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methylbenzamid (375)	288
11.22 Synthese der Benzothiazole 387-393	288
11.22.1 Herstellung von 2-(4-Nitrophenyl)benzo[d]thiazol (378)	288
11.22.2 Herstellung von 4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)benzenamin (379)	289
11.22.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Benzothiazole 387-393	289
11.22.3.1 Herstellung von <i>N</i> -(4-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-benzenamin (387)	289
11.22.3.2 Herstellung von <i>N</i> -(3,5-Difluorbenzyliden)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-benzenamin (388)	290
11.22.3.3 Herstellung von <i>N</i> -(2,3,4-Trimethoxybenzyliden)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-benzenamin (389)	291
11.22.3.4 Herstellung von <i>N</i> -(2-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-benzenamin (390)	291
11.22.3.5 Herstellung von <i>N</i> -((1 <i>H</i> -Indol-3-yl)methylen)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-benzenamin (391)	292

11.22.3.6 Herstellung von <i>N</i> -(4-Methoxybenzyliden)-4-(benzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl)-benzenamin (392)	292
11.22.3.7 Herstellung von <i>N</i> -(3,4-Dimethylbenzyliden)-4-(benzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl)-benzenamin (393)	293

12 LITERATURVERZEICHNIS 294

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Vergleich eines Hirnquerschnitts von einem gesunden Menschen mit dem eines Alzheimererkrankten. ^[2]	2
Abbildung 1.2. AChE-Hemmer, NMDA-Antagonist und Nimodipin.	7
Abbildung 1.3. Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. ^[13]	10
Abbildung 1.4. Proteolytische Prozessierung von APP.	12
Abbildung 1.5. APP-Aminosäuresequenz der A β -Domäne.	13
Abbildung 1.6. Standardnomenklatur für Substratreste und entsprechende Enzymbindungsstellen.	15
Abbildung 1.7. Säure-Base-Mechanismus der Hydrolyse von Peptiden durch Aspartylproteasen.	15
Abbildung 1.8. Strukturen der am häufigsten verwendeten <i>transition-state isosteres</i>	16
Abbildung 1.9. Schematische Darstellung von BACE.	18
Abbildung 1.10. Strukturen der hoch potenten BACE-Inhibitoren OM99-2, OM00-3.	20
Abbildung 1.11. Kristallstruktur von BACE komplexiert mit OM99-2 (PDB: 1FKN). .	20
Abbildung 1.12. Nicht-peptidische BACE-Inhibitoren. ^[79]	22
Abbildung 1.13. Modell für Presenilin1. ^[85]	23
Abbildung 1.14. γ -Sekretase-Inhibitoren. ^[80]	27
Abbildung 1.15. Modell und Isoform von Tau. ^[145]	31
Abbildung 1.16. Mechanismus der <i>in vitro</i> Tau-Aggregation. ^[118]	32
Abbildung 1.17. Verknüpfungen von GSK3 und der Alzheimer-Demenz.	37
Abbildung 1.18. A β verursacht oxidativen Stress.	39
Abbildung 4.1. Strukturen der HIV-1-Inhibitoren Tipranavir (20) und eines 4-Hydroxy-2-on-Derivats (21).	57
Abbildung 4.2. Eingesetzte Startmaterialien der Tetramsäuresynthesen 43-85	62
Abbildung 4.3. Strukturen der Tetramsäuren 43-60	63
Abbildung 4.4. Strukturen der Tetramsäuren 61-76	64
Abbildung 4.5. Strukturen der Tetramsäuren 77-85	65
Abbildung 4.6. Strukturen der Tetronsäuren 95-100	67
Abbildung 4.7. Strukturen der <i>N</i> -substituierten Tetramsäuren 110-124	69
Abbildung 4.8. Prinzip von FRET.	72
Abbildung 4.9. Struktur des Substrats Lucifer yellow-SEVNLDAEFKR-Dabsyl 133	73

Abbildung 4.10. Ausgewählte Beispiele von Tetron- und Tetramsäuren. ^[223]	74
Abbildung 4.11. Vermutete Interaktionen der <i>N</i> -substituierten Tetramsäuren.	77
Abbildung 4.12. „Docking“ von Verbindung 123 in die aktive Tasche von BACE1. ..	78
Abbildung 5.1. Strukturen der potenten γ -Sekretase-Inhibitoren DAPT (13) und Ly411575 (14).	81
Abbildung 5.2. Strukturen der DAPT-analogen Verbindungen 149-154 mit säurelabiler Gruppe am C-Terminus.	83
Abbildung 5.3. Stabilisierung des Diazodipols durch die Carbonylfunktion.	84
Abbildung 6.1. Strukturen der γ -Sekretase-Inhibitoren 17 und 173	92
Abbildung 6.2. Dihydropyridin-Verbindung 176	95
Abbildung 7.1. Struktur der Substanz AR-A014418 (177).	97
Abbildung 7.2. Strukturen der Verbindungen aus der 1. Generation 180-191	98
Abbildung 7.3. Strukturen der Verbindungen 194-197	99
Abbildung 7.4. Strukturen der Verbindungen aus der 2. Generation 200-203	100
Abbildung 7.5. Graphische Auswertung der A β -Hemmung (180-190).	101
Abbildung 7.6. Graphische Auswertung der A β -Hemmung (188, 200-202).	102
Abbildung 7.7. Graphische Auswertung des N2a-Tau4R-EGFP-Zellassays.	103
Abbildung 7.8. Graphische Auswertung des Hefezellen-Assays.	104
Abbildung 7.9. BACE-Inhibitor 204 und der „Torrey Pines“ γ -Sekretase Modulator 18	105
Abbildung 8.1. Strukturen des <i>training sets</i> 205-215	110
Abbildung 8.2. Strukturen des <i>training sets</i> 216-225	111
Abbildung 8.3. Effekt des Poling-Terms auf den Konformationsraum. ^[284]	117
Abbildung 8.4. Phasen des HypoGen-Algorithmus.	120
Abbildung 8.5. Schema der konstruktiven Phase des HypoGen-Algorithmus.	121
Abbildung 8.6. Schema der subtraktiven Phase des HypoGen-Algorithmus.	122
Abbildung 8.7. Verbindung 250 überlagert mit einem 4- <i>feature</i> pharmakophoren Modell.	124
Abbildung 8.8. Verbindung 246 überlagert mit einem 5- <i>feature</i> pharmakophoren Modell.	125
Abbildung 8.9. Veränderung der spektralen Eigenschaften von Thioflavin-S während der Aggregation von Tau.	126
Abbildung 8.10. Strukturen der ausgewählten Verbindungen 226-239 und entsprechende Ergebnisse des biologischen Tests.	127

Abbildung 8.11. Strukturen der ausgewählten Verbindungen 240-244 und entsprechende Ergebnisse des biologischen Tests.	128
Abbildung 8.12. Strukturen und biologische Daten der Verbindungen 245-255 aus der 2. Generation.	129
Abbildung 9.1. Strukturen der Tau-Aggregations-Inhibitor-Leitstrukturen.	132
Abbildung 9.2. Strukturen der Carbonsäurederivate 266-272 und Bromacetophenone 287-293	136
Abbildung 9.3. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide 294-300 mit den entsprechenden Ausbeuten.	136
Abbildung 9.4. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide 301-314 mit den entsprechenden Ausbeuten.	137
Abbildung 9.5. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide 315-324 mit den entsprechenden Ausbeuten.	138
Abbildung 9.6. Strukturen der Carbonsäurechloride 325-327 und des Bromacetophenons 331	139
Abbildung 9.7. Phenylthiazolbenzhydrazide 332-341 und Ausbeuten.	140
Abbildung 9.8. Strukturen der Aldehyde 380-386	148
Abbildung 9.9. Strukturen der Benzothiazole 387-393	149
Abbildung 9.10. Veränderung der spektralen Eigenschaften von Thioflavin-S während der Aggregation von Tau.	150
Abbildung 9.11. Beispiel für eine graphische Auswertung der Tau-Aggregations- und Tau-Depolymerisations-Inhibition.	151
Abbildung 9.12. Grundgerüst der Phenylthiazolbenzhydrazide.	152
Abbildung 9.13. Schema zur Identifizierung der Phenylthiazolbenzhydrazid- Leitstruktur (235).	155
Abbildung 9.14. Struktur des Thiazolhydrazidgrundgerüsts.	156
Abbildung 9.15. Strukturvorschläge von Substanzen, die z. T. eine Steigerung der Aktivität erwarten lassen.	157

Verzeichnis der Schemata

Schema 4.1. Retrosynthetische Betrachtung der Tetramsäuresynthese.	58
Schema 4.2. Retrosynthetische Betrachtung der Tetronsäuresynthese.	59
Schema 4.3. Retrosynthetische Betrachtung der Synthese von <i>N</i> -substituierten Tetramsäuren.	60
Schema 4.4. Methoden zur Synthese der Thioessigsäure-Derivate 30, 31, 35, 38-41 (Methode A) und der Substanzen 33, 34, 36 und 37 (Methode B).	61
Schema 4.5. Festphasenunterstützte Synthese der Tetramsäuren 43-85	61
Schema 4.6. Festphasenunterstützte Synthese der Tetronsäuren 95-100	66
Schema 4.7. Festphasenunterstützte Synthese der <i>N</i> -substituierten Tetramsäuren 110-124	68
Schema 4.8. Synthese der Sulfotetramsäuren 131 und 132	71
Schema 5.1. Retrosynthese von DiazoDAPT 144	82
Schema 5.2. Umlagerung von protoniertem Cyclopropylmethanol zu einem Cyclobutylkation als Testmöglichkeit für die Säuresensitivität möglicher Presenilin-Inhibitoren.	82
Schema 5.3. Synthese von DiazoDAPT 144	85
Schema 5.4. Synthese von DAPT (13).	86
Schema 5.5. Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate 149-153	87
Schema 5.6. Alternative Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT- Verbindung 152	88
Schema 6.1. Retrosynthese der potentiellen γ -Sekretase-Inhibitoren 170 und 171	93
Schema 6.2. Synthese der γ -Sekretase-Inhibitoren 170 und 171	94
Schema 7.1. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung 177	97
Schema 7.2. Synthese von Verbindung 180	99
Schema 7.3. Synthese von Verbindung 196	99
Schema 9.1. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung 235	133
Schema 9.2. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung 261	134
Schema 9.3. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 294-324	135
Schema 9.4. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 332-341	139
Schema 9.5. Synthese der Substanzen 346/347	141
Schema 9.6. Synthese der Substanzen 350/351	142
Schema 9.7. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 357-358	143
Schema 9.8. Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides 364	144

Schema 9.9. Synthese der Verbindung 370	145
Schema 9.10. Synthese der Verbindung 375	147
Schema 9.11. Synthese der Verbindungen 387-393	148

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1. Prävalenz von Demenzen nach dem Alter.	2
Tabelle 1.2. Beispiele von Proteasen, ihrer Funktion und Einfluss auf eine Erkrankung.	14
Tabelle 1.3. Vermeintliche Substrate der Glykogen Synthase Kinase 3.	35
Tabelle 2.1. Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen.	46
Tabelle 4.1. Ausbeute, Reinheit und Aktivität der Tetransäuren 43-85	75
Tabelle 4.2. Ausbeute, Reinheit und Aktivität der Tetransäuren 95-100 , der <i>N</i> - substituierten Tetransäuren 110-124 und der Sulfotetransäuren 130 und 131	76
Tabelle 8.1. Berechnete ADME-Eigenschaften.	130
Tabelle 9.1. Biologische Aktivitäten der Phenylthiazolbenzhydrazide.	152
Tabelle 9.2. Ergebnisse des Lactatdehydrogenase-Assays.	153

Abkürzungen und Akronyme

A β	Amyloid- β -Peptid	BBB	<i>blood brain barrier</i>
Abb.	Abbildung	Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Ac	Acetyl	Bzl	Benzyl
AChE	Acetylcholinesterase	C	<i>configuration</i>
AD	Alzheimer-Demenz	c	<i>configuration coefficient</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>	CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
ADI	<i>Alzheimer's Disease international</i>	CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
ADME	<i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>	DAPA	(2-(2-(3,5-Difluorphenyl)-acetoxy)-propionylamino)-phenylelessigsäure
AD2	Antikörper, der die Ser ₃₉₆ - und Ser ₄₀₄ -Phosphorylierung von Tau erkennt	DAPT	(2-(2-(3,5-Difluorphenyl)-acetoxy)-propionylamino)-phenylelessigsäure- <i>tert</i> -butylester
AICD	<i>APP intracellular domain</i>	DC	Dünnschichtchromatographie
Aph-1	<i>anterior pharynx defective 1</i>	DC ₅₀	effektive Konzentration mit 50% des Maximaleffektes
APLP	<i>amyloid precursor like proteins</i>	DCC	Dicyclocarbodiimid
Apo-E	Apolipoprotein-E	DCM	Dichlormethan
APP	<i>amyloid precursor protein</i>	DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
Aq.	Äquivalent	DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
aqSol	Löslichkeit in wässriger Lösung bei 1 μ M	DMF	Dimethylformamid
arom.	aromatisch	DMSO	Dimethylsulfoxid
AS	Aminosäure	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ATP	Adenosintriphosphat	E	Enzym
AT100	Antikörper, der die Thr ₂₁₂ - und Ser ₂₁₄ -Phosphorylierung von Tau erkennt	E	error
a. u.	<i>arbitrary unit</i>	e	error coefficient
BACE	β -Sekretase	EDAC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid
		EE	Essigsäureethylester

EI	Elektronenstoßionisation (MS)	K_D	Dissoziationskonstante
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	K_i	Verdrängungskonstante
ER	Endoplasmatisches Retikulum	K_M	Michaelis-Konstante
ESI	Elektronensprayionisation (MS)	KOBu ^t	Kalium- <i>tert</i> -butylat
EtOH	Ethanol	konz.	konzentriert
FAD	<i>Familiar Alzheimer Disease</i>	L	Ligand
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl	lat.	lateinisch
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	LBHB	<i>low-barrier</i> H-Brücken
FTDP-17	<i>Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17</i>	LDH	Lactatdehydrogenase
GACE	γ -Sekretase	Lsg.	Lösung
ges.	gesättigt	MA	Aktivität der <i>most active compound</i>
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3	MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
h	Stunde(n)	MeOH	Methanol
HBHB	<i>high barrier</i> H-Brücken	mCPBA	<i>meta-Chloroperoxybenzoic acid</i>
HD	hydrophobe Domäne(n)	MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
HIA	<i>human intestinal absorption</i>	min	Minute(n)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus	MS	Massenspektrometrie
4HNE	4-Hydroxynonenal	MSD	Merck Sharp & Dohme
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenztriazol·H ₂ O	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
HPLC	<i>high performance liquid chromatographie</i>	<i>m/z</i>	Masse/Ladung
HTS	<i>high throughput screening</i>	n. a.	nicht aktiv
I	Inhibitor	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50%ige Hemmung bewirkt	n. b.	nicht bestimmt
kat.	katalytisch	NFTs	<i>neurofibrillary tangles</i>
		NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat
		NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon	TACE	<i>tumor necrosis cleaving enzyme</i>
NSAIDs	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>	TEA	Triethylamin
P	Protein	TFA	Trifluoressigsäure
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	THF	Tetrahydrofuran
PDB	<i>protein data bank</i>	ThS	Thioflavin-S
PEN-2	<i>presenilin enhancer 2</i>	TMD	Transmembran-Domäne
PHFs	<i>paired helical filaments</i>	tPSA	topological polar surface area
PL	Protein-Ligand-Komplex	Unc	uncertainty
PP	Propeptid	W	<i>weight</i>
PS1	Presenilin1	w	<i>weight coefficient</i>
PSA	<i>polar surface area</i>	WDI	<i>world drug index</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytri-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat	Z	Benzyloxycarbonyl
PyBroP	Brom-tripyrrolidin-phosphoniumhexafluor-phosphat	δ	chemische Verschiebung
quant.	quantitativ	λ	Wellenlänge
RCDS	<i>redox chemical delivery systems</i>		
rms	<i>root mean square</i>		
RT	Raumtemperatur		
SAR	<i>structure-activity relationship</i>		
Schmp.	Schmelzpunkt		
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>		
SP	Signalpeptid		
SOD	Superoxid Dismutase		
Tab.	Tabelle		

Verzeichnis der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Die Alzheimersche Krankheit

„Wie heißen Sie?“ - „Auguste.“ - „Familiennamen?“ - „Auguste.“ - „Wie heißt ihr Mann?“ – Auguste antwortet nach zögern: „Ich glaube Auguste.“ Mit diesem bedrückenden Dialog beginnt eine Akte der Städtischen Irrenanstalt Frankfurt am Main, in der 1901 zum ersten Mal eine Erkrankung beschrieben wurde, die inzwischen immer größere Bedeutung erlangt hat: die Alzheimersche Krankheit.

Die 51-jährige Patientin Auguste D. wurde von ihrem Mann eingewiesen, da sie an zunehmender Gedächtnisschwäche litt. Sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht, schleppte Gegenstände hin und her, versteckte sie und zuweilen glaubte sie, man wolle sie umbringen. Als Auguste D. fünf Jahre später starb, untersuchte der Neurologe Alois Alzheimer deren Gehirn und fand darin ungewöhnliche Eiweißablagerungen in Form von Plaques.

Die nach ihm benannte Alzheimersche Krankheit ist eine fortschreitende Demenzerkrankung (von lat. *demens*, „verwirrt“), die vorwiegend im Alter auftritt und mit einer irreversiblen Abnahme der Gehirn- und Gedächtnisleistung einhergeht. Die Krankheit beginnt mit scheinbar zufälliger Vergesslichkeit und endet im vollständigen Verlust des Verstandes. Nach und nach sterben Nervenzellen und ihre Verbindungen im Gehirn ab. Der Zerfall beginnt an denjenigen Orten, die mit Gedächtnis und Informationsverarbeitung zu tun haben, weshalb ein Schrumpfen dieser Gehirnregionen bei Alzheimerpatienten festzustellen ist (Abb. 1.1). Direkt nach Schlaganfällen ist Morbus Alzheimer die häufigste schwere Störung der Hirnfunktion im Alter.

Bislang ist die Alzheimersche Krankheit nicht heilbar, das Fortschreiten der Symptome lässt sich jedoch vorübergehend hinauszögern. Trotz großer Forschungsfortschritte in den letzten Jahren bleibt die genaue Ursache von Morbus Alzheimer unbekannt. Zwei krankhafte Kennzeichen, die Amyloid-Ablagerungen und die Neurofibrillären Bündel, welche sich im Gehirn von Alzheimerpatienten zeigen, spielen allerdings bei den meisten Erklärungsversuchen eine entscheidende Rolle.

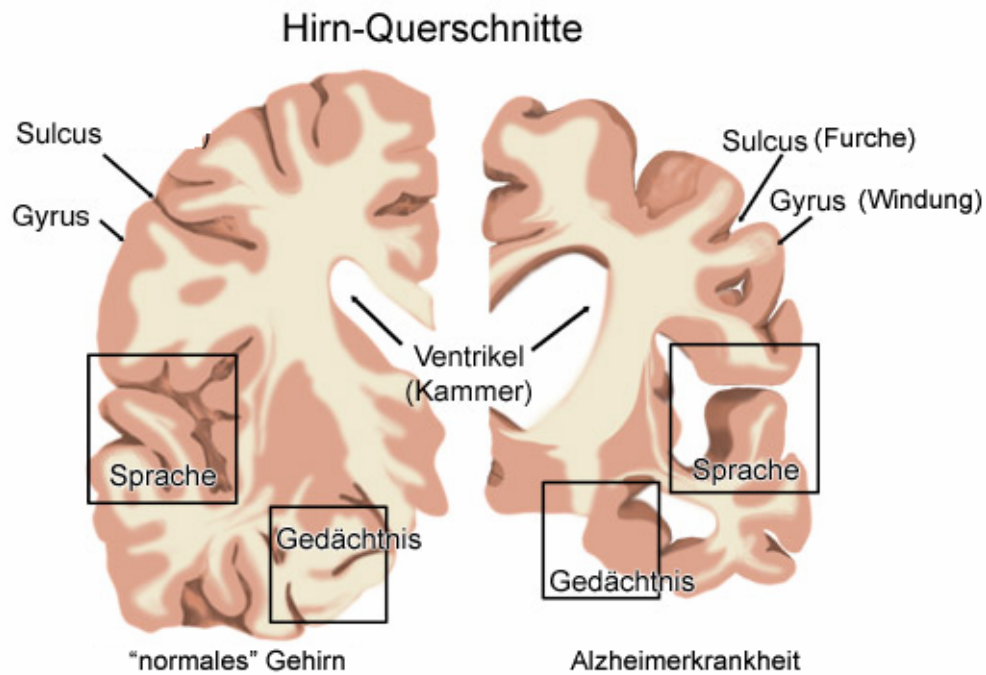


Abbildung 1.1. Vergleich eines Hirnquerschnitts von einem gesunden Menschen mit dem eines Alzheimererkrankten.^[2]

1.1 Epidemiologie der Alzheimerschen Krankheit

In Deutschland leben gegenwärtig nahezu eine Million Demenzkranke; zwei Drittel von ihnen sind von der Alzheimerkrankheit betroffen. Die Anzahl der Neuerkrankungen beträgt im Laufe eines Jahres fast 200.000. Die Prävalenzrate steigt mit dem Alter an (Tab. 1.1). Während nur 2-3% bei den 70-75-Jährigen betroffen sind, erhöht sich die Zahl bei den über 90-Jährigen auf mehr als ein Drittel.^[3]

Altersgruppe	Mittlere Prävalenzrate (%)	Prognose der Krankenzahl in Deutschland
65-69	1,2	48.000
70-74	2,8	99.000
75-79	6	171.000
80-84	13,3	173.000
85-89	23,9	272.000
90 und älter	34,6	172.000
65 und älter	7,2	935.000

Tabelle 1.1. Prävalenz von Demenzen nach dem Alter.^[3] Als Prävalenz wird die Anzahl der Kranken in der Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt bezeichnet.

Morbus Alzheimer ist im Wesentlichen eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Im statistischen Mittel beträgt die Wahrscheinlichkeit, im weiteren Altersverlauf eine Demenz zu bekommen, wenn ein Alter von 65 Jahren erreicht worden ist, für Männer derzeit 16%, für Frauen aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung hingegen 34,5%.^[4] Die durchschnittliche Krankheitsdauer vom Beginn der Symptome bis zum Tod wird mit 4,7 bis 8,1 Jahren für die Alzheimer-Demenz angegeben. Im Allgemeinen ist die verbleibende Lebenserwartung unter Frauen höher als unter Männern.^[5]

In den nächsten 30 Jahren wird nach Vorausberechnungen des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2000 die Altenbevölkerung um weitere 7 Millionen Menschen zunehmen. Sollten keine nachhaltigen Erfolge in der Therapie bei der Alzheimer-Demenz erzielt werden, wird die Zahl der Krankheitsfälle in Deutschland Jahr für Jahr um etwa 20.000 ansteigen. Bis zum Jahr 2030 wird sich die Krankenzahl um eine halbe Million erhöht und bis zum Jahr 2050 sogar mehr als verdoppelt haben.^[6]

Mit der Pflege dieser enormen Anzahl von Demenzpatienten sind erhebliche volkswirtschaftliche Kosten verbunden. Nach einer Studie ist in Deutschland pro Patient und Jahr von Gesamtkosten in Höhe von knapp 44.000 Euro auszugehen.^[7] Die Demenz zählt zu den teuersten Krankheitsgruppen im höheren Alter, wobei ein steiler Kostenanstieg mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung festzustellen ist. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen, dass die indirekten Kosten (hier vor allem der unbezahlte Betreuungsaufwand der Angehörigen von durchschnittlich 6 bis 10 Stunden pro Tag) den höchsten Anteil der Gesamtkosten ausmachen; dabei sind Erkrankungsfolgekosten auf Seiten der Pflegenden aufgrund psychischer und körperlicher Belastungen zumeist nicht eingerechnet.

1.2 Merkmale von Morbus Alzheimer

Die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit lässt sich generell in drei Abschnitte unterteilen.^[8] Zu den ersten Symptomen zählen Gedächtnisschwund und ein vermindertes Lernvermögen. Der Kranke fällt in dieser Phase meist noch nicht auf, da auch Gedächtnisleistungen gesunder Menschen im Alter nachlassen. In der nächsten Stufe treten Sprachstörungen, Sinnestäuschungen und Orientierungslosigkeit auf. Im Endstadium kommt es schließlich zum vollständigen Verlust der

Sprache, des Gedächtnisses und der Körperkontrolle, was eine permanente Betreuung unumgänglich macht.

Die Alzheimersche Krankheit ist eine sehr komplexe und genetisch heterogene Erkrankung, bei der man zwischen den sporadischen und den selteneren familiären Formen unterscheidet. Im Gegensatz zu Patienten mit sporadischer Alzheimer-Demenz treten die ersten klinischen Anzeichen bei genetisch bedingten Erkrankungen schon im mittleren Lebensabschnitt auf. Mutationen verschiedener Gene konnten mit der familiären Form der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht werden. Zu den wichtigsten zählen genetische Veränderungen auf Chromosom 21, welche das β -Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) kodieren, sowie Mutationen auf Chromosom 14 (Presenilin1) und Chromosom 1 (Presenilin2). Neuropathologisch unterscheiden sich sowohl die sporadische Form als auch die familiäre Form der Alzheimer-Demenz kaum. Neben der Atrophie bestimmter Hirnareale lassen sich in den Hirnen der Alzheimerpatienten charakteristische proteinhaltige Ablagerungen nachweisen: die „Amyloid-Plaques“ und die „Neurofibrillären Bündel“.

Bei den „Amyloid-Plaques“ handelt es sich um kompakte extrazelluläre Aggregate des „Amyloid- β -Peptides“ ($A\beta$),^[10] welche vor allem in limbischen Gehirnregionen, wie dem Hippocampus und der Amygdala, sowie kortikalen als auch subkortikalen Bereichen zu finden sind.^[9] Die „Neurofibrillären Bündel“ (*neurofibrillary tangles*; NFTs) sind intrazelluläre flammenförmige Anhäufungen abnormer Filamente in den Nervenzellen. Hauptbestandteil dieser Neurofibrillären Bündel ist das in pathologischer Weise veränderte Tau-Protein, ein neuronales Mikrotubulin assoziiertes Protein.^[11,12] Dieses veränderte Tau ist im Gegensatz zum löslichen, „normalen“ Tau nicht an Mikrotubuli gebunden, sondern abnormal hochgradig phosphoryliert und teilweise fragmentiert. Ausgehend von der Identifizierung dieser proteinhaltigen Ablagerungen wurde vor dem Hintergrund der molekulargenetischen Ergebnisse der familiären Form der Alzheimer-Demenz die Hypothese der β -Amyloid-Toxizität abgeleitet. Danach ist die Bildung bzw. Ablagerung des $A\beta$ über eine komplexe pathologische Kaskade mit der Entstehung der Neurofibrillären Bündel verbunden, die letztendlich zum neuronalen Tod der Nervenzellen führt und somit das klinische Bild einer Alzheimer-Demenz begründet.^[13]

Die Diagnose von Morbus Alzheimer wird von verschiedenen Problemen begleitet. Vor allem besteht die Schwierigkeit, die Krankheit im Anfangsstadium zu erkennen

und von anderen Formen der Demenz zu unterscheiden. Der klinische Verdacht stützt sich auf neuropsychologische Tests und bildgebende Verfahren wie Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Positronen Emissionstomographie und Photonen Emissionstomographie.^[14-16] Biomarker für eine frühe biochemische Diagnose befinden sich in der Testphase.^[17,18] Substanzen, die an für die Alzheimersche Krankheit spezifischen und relevanten Proteine binden und über bildgebende Verfahren nachweisbar sind, wären wünschenswert, sind allerdings erst im Anfangsstadium ihrer Entwicklung,^[19] so dass eine definitive Diagnose oft erst post-mortem anhand der Hirnpathologie gestellt werden kann.^[20]

Bisher gibt es keine Behandlung, mit der die Alzheimer-Demenz geheilt werden kann. Medikamente, die momentan zur Verfügung stehen, helfen lediglich Symptome der Erkrankung zu kontrollieren bzw. Erregungszustände, Depressionen oder psychotische Folgen (Halluzinationen oder Verwirrungen) zu mildern, welche im Laufe der Erkrankung auftreten können. Arzneistoffe, die die Bildung von A β -Aggregaten bzw. die Entstehung der Neurofibrillären Bündel verhindern, sind daher von großem Interesse und besitzen eventuell das Potential, den Verlauf der Alzheimer-Demenz zu stoppen.

1.3 Risikofaktoren

Der größte Anteil der Alzheimererkrankungen ist sporadischer Herkunft, nur 5-10% sind auf genetische Mutationen familiärer Art zurückzuführen. Trotzdem zeigen molekulargenetische Analysen, dass mehrere Gene existieren, die das Risiko einer Alzheimererkrankung beeinflussen. Das Apolipoprotein Gen-E (Apo-E) ist eines der ersten Gene, die in Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz gebracht werden konnten. Apo-E spielt eine regulierende Rolle im Lipidmetabolismus, der Cholesterinaufnahme und intrazellulären Freisetzung von Cholesterin. Es gibt drei verschiedene Apo-E-Allele, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, wobei Individuen, die vermehrt das $\epsilon 4$ produzieren, ein höheres Risiko besitzen, an Morbus Alzheimer zu erkranken.^[21] Der genaue Mechanismus, wie $\epsilon 4$ Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt, ist nicht geklärt. Vieles spricht dafür, dass $\epsilon 4$ die A β -Aggregation fördert, den oxidativen Stress erhöht und die neuronale Flexibilität beeinträchtigt.^[1]

Neben den genannten genetischen Risikofaktoren stehen genau wie bei anderen altersabhängigen Erkrankungen (Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes, Krebs usw.)

bestimmte Verhaltensweisen wie Ernährung, Lebensstil und Umwelteinflüsse im Blickpunkt des Interesses. Von einem rein wissenschaftlichen Standpunkt betrachtet, können allerdings keine fundierten Aussagen darüber getroffen werden, wie und ob solche Einflüsse in den Krankheitsverlauf eingreifen. Epidemiologische Erkenntnisse zeigen, dass Faktoren wie niedriger Bildungsstand, Vorhandensein von Kopfverletzungen, ständiger Verzehr von fettreicher und kalorienreicher Kost sowie Bewegungsmangel das Risiko für eine Erkrankung an Morbus Alzheimer erhöhen.^[22,23] Einfaches Gedächtnistraining dagegen stärkt die synaptische Plastizität im Hippocampus und wirkt für Neuronen schützend.^[24]

Folsäurearme Ernährung wiederum steigert das Risiko der Alzheimererkrankung wahrscheinlich in Folge einer Erhöhung des Homocysteingehaltes.^[23] Neben Folsäure scheinen auch gewisse Lipide und Spurenelemente wie Kupfer oder Eisen Einfluss auf die Entstehung von Morbus Alzheimer zu nehmen.^[22,25] Trotz wachsender Anhaltspunkte über einen möglichen Zusammenhang zwischen Ernährung und Alzheimer-Demenz, müssen weitere Forschungsergebnisse abgewartet werden, um sagen zu können, welche Stoffe aus der Nahrung den Krankheitsverlauf positiv oder negativ beeinflussen.

1.4 Etablierte Therapieformen und neue Ansätze

Einige hundert Verbindungen stehen momentan in der Entwicklungsphase zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Lediglich 10% davon sind für die Therapie von Alzheimerpatienten bestimmt. Eine Beseitigung der Ursache oder gar eine Prophylaxe ist momentan nicht möglich. Ziel der medikamentösen Behandlung ist deshalb oft, den Verlust der kognitiven Funktionen und die Progression der Erkrankung zu verlangsamen.

Acetylcholinesterasehemmer (AChE-Hemmer), wie Galantamin (**1**), Donepezil (**2**), Tacrin (**3**) und Rivastigmin (**4**) (Abb. 1.2) verbessern Symptome von Alzheimerpatienten, indem sie dafür sorgen, dass der Botenstoff Acetylcholin den Nervenzellen länger zur Verfügung steht. Die Weiterleitung von Informationen im Gehirn wird verbessert.^[26-28] Für die Effektivität der AChE-Hemmer bleibt eine Restfunktion der Nervenzellen notwendig, was die Gabe dieser Medikamente nur in den Anfangsstadien der Erkrankung sinnvoll macht. Tacrin wird heute aufgrund

seiner leberschädigenden Wirkung im Gegensatz zu den anderen drei AChE-Hemmern kaum noch verwendet.

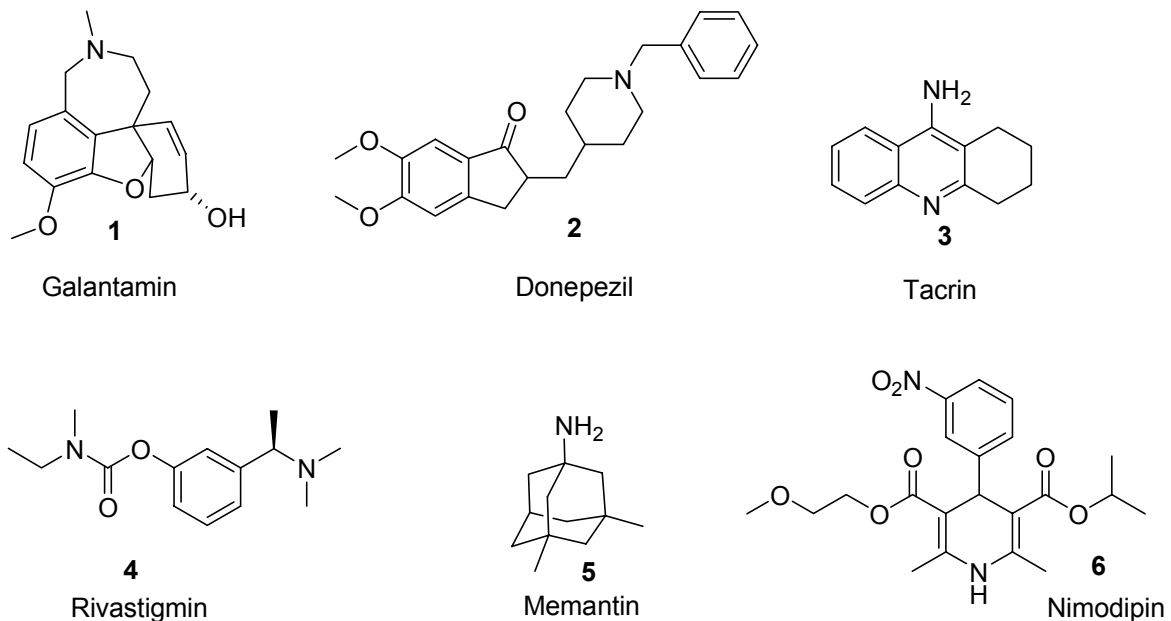


Abbildung 1.2. AChE-Hemmer, NMDA-Antagonist und Nimodipin (ein Calciumantagonist).

Memantin (**5**), ein *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Antagonist (NMDA-Antagonist), verändert die schädlichen Auswirkungen von Glutamat an den Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren).^[29] Wissenschaftler von Eli Lilly synthetisierten Memantin 1960 zunächst als Anti-Diabetes-Mittel, heute wird es meist bei mittelschweren und schweren Formen der Demenz eingesetzt, wo es dem Schutz der Nervenzelle vor dem Zelltod dienen soll. Im Blickpunkt der Alzheimerforschung vieler Pharmafirmen steht der Wunsch nach einer Möglichkeit zur Impfung gegen die Erkrankung, insbesondere gegen das für den Krankheitsverlauf wohl entscheidende Amyloid- β -Peptid ($A\beta$). AN-1792, ein synthetisches $A\beta_{42}$ -Peptid, zeigt in Tierversuchen an transgenen Mäusen vielversprechende Ergebnisse.^[30] Die Vakzine verhindern die Bildung der Plaques im Gehirn junger Tiere und reduzieren Ausmaß und Fortschreiten der Plaques und der damit verbundenen neuropathologischen Effekte in älteren Mäusen. Nachdem es allerdings bei vier Patienten aus Frankreich zu Entzündungen des Zentralnervensystems kam, wurde die klinische Studie abgebrochen.^[31] Ergebnisse epidemiologischer Studien zeigen, dass das Alzheimerisiko von Personen, die entzündungshemmende Medikamente, so genannte *nonsteroidal anti-*

inflammatory drugs (NSAIDs), nehmen, erheblich geringer ist als das von Kontrollpersonen.^[32] Die NSAIDs stehen allerdings in Verdacht, kardiovaskuläre Probleme hervorrufen zu können, wenn sie auf Dauer und in den Mengen, die für eine Alzheimerbehandlung notwendig sind, eingenommen werden. Ihre positive Wirkung für Alzheimerpatienten liegt wahrscheinlich in einer direkten Beeinflussung der Spaltung des APP, was ihnen großes Interesse in der Alzheimerforschung einbringt.

Ein Zusammenhang zwischen Cholesterin und der Alzheimerkrankheit wird nicht erst seit der Identifizierung des Apolipoproteingens-E als Risikofaktor für die Erkrankung vermutet. Genau wie die NSAIDs haben auch Statine, eine Klasse von cholesterinsenkenden Wirkstoffen, einen positiven Effekt auf den Verlauf der Alzheimer-Demenz.^[33,34] Untersuchungen in Zellkulturen und *in vivo* ergaben eine Reduktion der Produktion des β -Amyloidpeptids durch Statine.^[35] Da das Gehirn Cholesterin nicht durch zirkulierende Plasmalipoproteine aufnimmt, gelangen an Neuronen nur kleine Mengen von exogenem Cholesterin, das meiste wird *de novo* synthetisiert. Wird diese Synthese durch Statine gehemmt, sinkt die Produktion und Sekretion von β -Amyloid, was die Vermutung nahe legt, dass die Aktivität der β -Sekretase vom Cholesteringehalt abhängt.^[36]

Die Calciumhypothese der Demenz stellt einen weiteren hochinteressanten Ansatzpunkt zur Entwicklung pharmakologischer Behandlungsstrategien dar, der auf die spezifischen Störungen der Calcium-Homöostase im Krankheitsverlauf von Alzheimerpatienten abzielt. Nimodipin (**6**), ein Antagonist von spannungsabhängigen Calciumkanälen vom L-Typ, reduziert die Anzahl der geöffneten Calciumkanäle, durch die Calcium aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere einströmen kann. Unter experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Calciumeinstroms Neuronen gegenüber schädlichem Einfluss schützen kann.^[37]

Trotz großer Fortschritte auf den verschiedensten Gebieten der Wirkstoffentwicklung, sind die erzielten Ergebnisse keinesfalls zufriedenstellend. Neue Therapieformen insbesondere neue potentielle Wirkstoffklassen, sind von großem Interesse, da keine der existierenden Möglichkeiten den Verlauf der Krankheit wirklich stoppt bzw. die Erkrankung heilt.

1.5 Molekulare Grundlagen der Alzheimerschen Krankheit

Charakteristisch für die Alzheimer-Demenz (AD) sind neben dem Verlust von Synapsen und dem Absterben von Neuronen zwei proteinhaltige Ablagerungen: die Amyloid-Aggregate und die Neurofibrillären Bündel. Beide bilden auch heute noch die Grundlage für die endgültige post-mortem Diagnose der Krankheit.^[38]

1.5.1 Der APP-Metabolismus

Die Amyloid-Plaques sind ausschließlich im extrazellulären Raum des Gehirns sowie im cerebralen Blutgefäßsystem nachweisbar.^[39] Sie bestehen aus ca. 8-10 nm großen Amyloid-Fibrillen, d.h. aus Polymeren des Amyloid- β -Peptides ($A\beta$). Mikroskopisch können zwei Subklassen von Plaques unterschieden werden: die neuritischen und die diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques sind durch einen dichten Amyloidkern, der von „dystrophen Neuriten“^[40] sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrocyten umgeben ist, gekennzeichnet.^[41] Die kompakten neuritischen Amyloid-Plaques sind spezifisch für die AD, während die diffusen Plaques auch in Gehirnen nicht dementer, alter Menschen nachweisbar sind.^[42]

Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen den Amyloid-Plaques, der Pathologie der AD und der neuronalen Degeneration im Zentralnervensystem bisher nicht definitiv geklärt werden konnte, nimmt die Bildung der Plaques nach der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ (Abb. 1.3) eine Schlüsselposition in der Entstehung der AD ein.^[42]

Entscheidend für diese Amyloid-Hypothese ist die abnormale post-translationale Proteolyse des APPs, die zur Bildung von $A\beta$ führt. $A\beta$ bildet zunächst lösliche Oligomere, die in den synaptischen Spalt gelangen können, wo sie die Reizleitung der Nervenzellen auf noch ungeklärte Art stören. $A\beta$ -Oligomere bilden außerdem unlösliche Amyloid-Fibrillen, die zu sphärisch anspruchsvollen Amyloid-Plaques anwachsen, welche für die Dysfunktion der Dendriten und Axone in Gehirnen von Alzheimererkrankten verantwortlich gemacht werden.^[43]

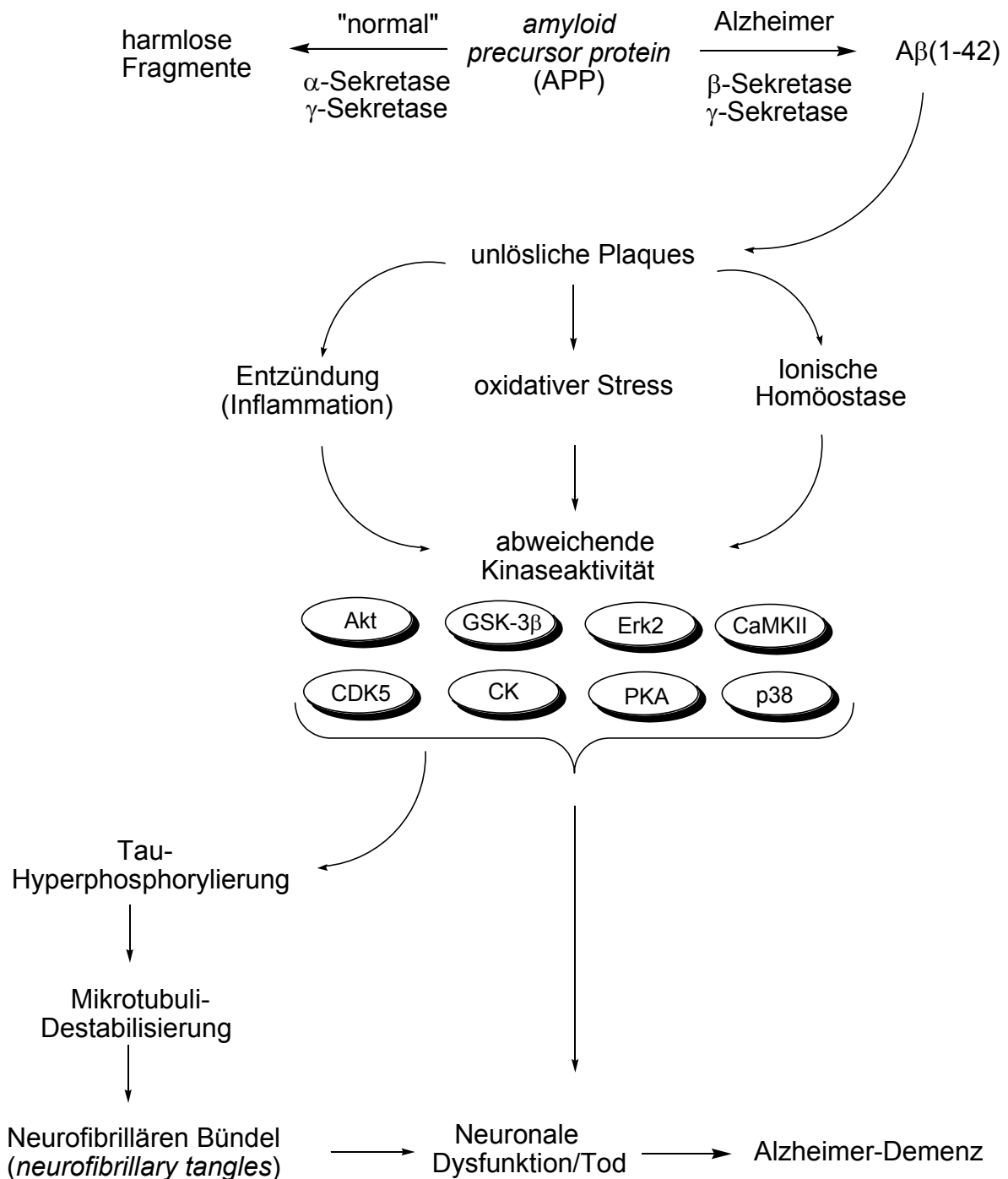


Abbildung 1.3. Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese.^[13]

APP, ein Typ 1 Transmembranprotein, besteht aus einer großen extrazellulären *N*-terminalen, einer transmembranen sowie einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Das Protein wird ubiquitär exprimiert.^[44] Durch alternatives Spleißen der APP-prä-mRNA entstehen insgesamt 8 Isoformen, wobei drei Isoformen (APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀) überwiegend im Gehirn vorkommen.^[45] Die physiologische Bedeutung von APP ist nicht eindeutig geklärt. Mäuse, denen das APP-Gen fehlt, zeigen relativ

geringe Veränderungen im zentralen Nervensystem und lediglich kleine Fehler in der Neuronenentwicklung.^[46,47] Scheinbar übernehmen die mit dem APP verwandten *amyloid precursor like proteins* (APLP1, APLP2) einige seiner Funktionen.

APP besitzt eine ähnliche Struktur wie die Integrine. Diese übernehmen Funktionen bei der Zelladhäsion und Zellerkennung, weshalb für membrangebundenes APP ähnliche Aufgaben diskutiert werden.^[48] Möglicherweise spielt APP auch eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Differenzierung während der Entwicklung von Nervenzellen im Gehirn.^[49,50] Eine Lokalisation von APP in Synapsen spricht zudem für eine Aufgabe bei der Neuritenextension bzw. bei der synaptischen Transmission.^[46]

APP stellt die einzige Quelle für A β dar, jedoch unterliegen auch APLPs der Prozessierung durch die α -, β - und γ -Sekretase. Die α -Sekretase, ein Mitglied der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*) wahrscheinlich TACE (*tumor necrosis cleaving enzyme*) oder ADAM10, hydrolisiert APP zwischen Lysin₆₈₇ und Leucin₆₈₈ (bzw. Lysin₁₆ und Lysin₁₇ der A β -Domäne) (Abb. 1.4). Dabei entsteht neben dem membrangebundenen C83-Fragment (ca. 10 kDa) ein lösliches sAPP α (ca. 90-100 kDa). Diesem Bruchstück konnten *in vitro* Funktionen als Serin-Protease-Inhibitor und als neuroprotektilem Faktor nachgewiesen werden.^[43] Da die α -Sekretase-Spaltung innerhalb der A β -Region stattfindet, wird die Entstehung von A β verhindert. Die Bildung von sAPP α wird durch die elektrische Tätigkeit des Neurons und der Aktivierung des muskarinen Acetylcholinrezeptors gesteigert. Eine erhöhte sAPP α -Spaltungsrate scheint daher in direktem Zusammenhang mit der neuronalen Aktivität zu stehen.^[1] Das C83-Fragment kann durch die γ -Sekretase weiter gespalten werden, indem die Peptidbindung von Val₇₁₁ oder die von Ile₇₁₃ hydrolisiert wird (Abb. 1.4). Es entsteht das Fragment P3 (ca. 3 kDa) und eine intrazelluläre APP-Einheit. Eine genaue physiologische Bedeutung konnte keinem dieser Bruchstücke zugeordnet werden.

Für die Bildung von A β und somit der amyloiden Plaques ist ein anderer Spaltungsweg von Bedeutung. Der Unterschied besteht in einer Primärspaltung von APP durch die β -Sekretase (BACE) anstelle der α -Sekretase. BACE hydrolisiert APP zwischen Met₆₇₁ und Asn₆₇₂, dadurch entsteht neben einem sAPP β -Fragment ein membrangebundenes C99-Bruchstück (ca. 12 kDa). Eine darauf folgende Prozessierung durch die γ -Sekretase führt letztendlich zur Ausbildung der A β -

Fragmente (ca. 4 kDa). Durch die beiden unterschiedlichen Schnittstellen der γ -Sekretase (Val_{711} oder Ile_{713}) können zwei unterschiedliche $\text{A}\beta$ -Typen gebildet werden. Das längere Fragment $\text{A}\beta_{1-42}$ ist hauptsächlich in den Plaques vorzufinden. Es neigt bei weitaus niedrigeren Konzentrationen zur Aggregation als die kürzere $\text{A}\beta$ -Form.^[43]

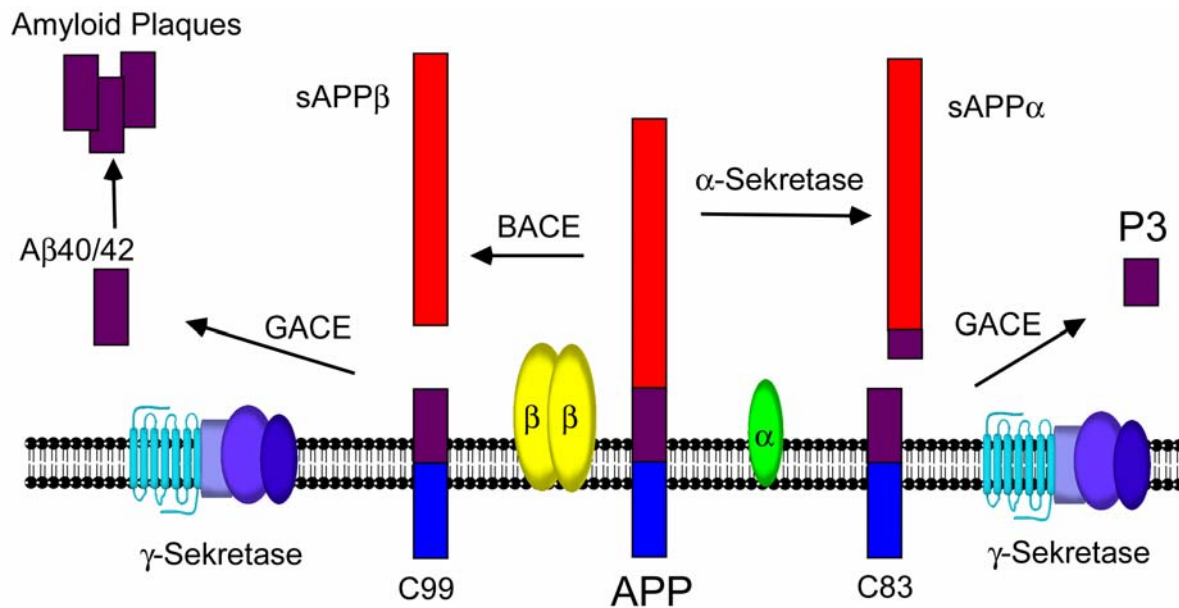


Abbildung 1.4. Proteolytische Prozessierung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase (BACE = β -Sekretase, GACE = γ -Sekretase).

Interessanterweise betreffen alle bisher bekannten familiären Alzheimer-Demenz-Mutationen (FAD-Mutationen) des APP-Gens die Umgebung der Schnittstellen der α -, β - oder γ -Sekretase (Abb. 1.5). Die angegebenen Mutationen bedingen entweder eine Erhöhung der Gesamtseznernierung des $\text{A}\beta$ -Peptids oder erhöhen spezifisch die Produktion des $\text{A}\beta_{42}$.^[51] Besonders erwähnt sei in diesem Zusammenhang die „schwedische“ Doppelmutteration K595N/M596L, die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen wurde.^[52] Die schwedische Mutation in APP erhöht die Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat und es entsteht vermehrt $\text{A}\beta$ -Peptid.^[53,54]

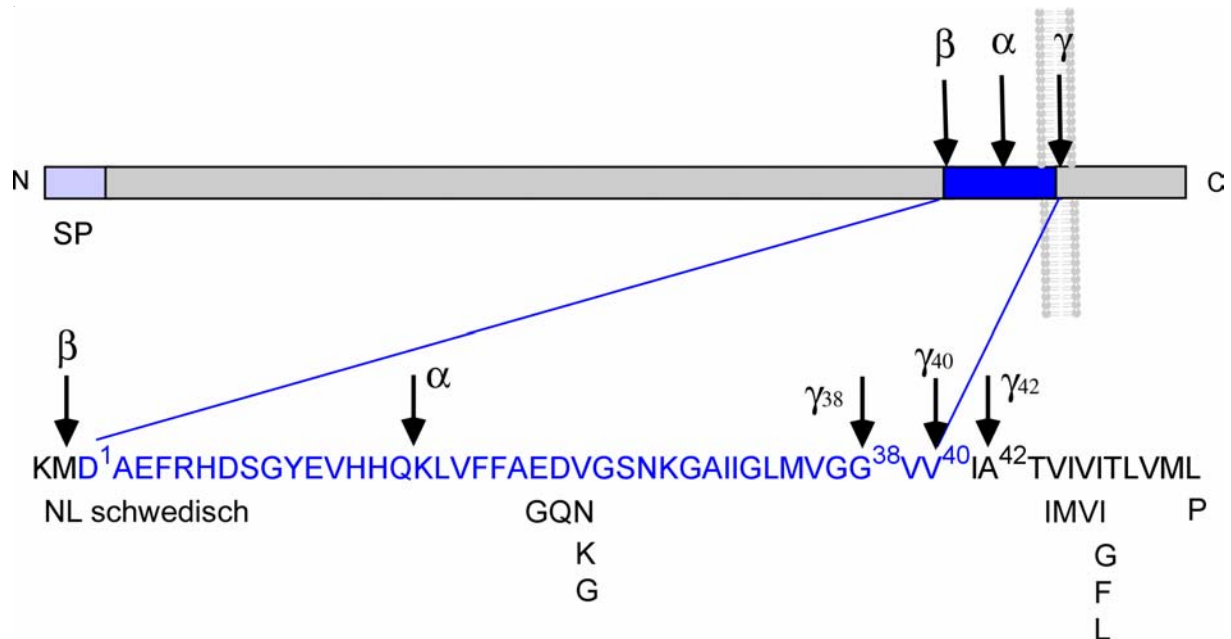


Abbildung 1.5. APP-Aminosäuresequenz der Aβ-Domäne (blau). Die jeweiligen durch die FAD-Mutationen bedingten Aminosäuresubstitutionen sind unterhalb der Sequenz angegeben. (SP = Signalpeptid)

1.5.2 Aspartylproteasen

Eine zentrale Position im Verständnis zur Entstehung der extrazellulären Proteinablagerungen – der Plaques – bei Alzheimerpatienten nimmt die Wirkungsweise der Aspartylproteasen ein. Sie gehören zu einer Klasse von Enzymen, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren und somit einen großen Einfluss auf die biochemischen Abläufe der Zelle ausüben.

Man unterscheidet im Allgemeinen fünf Hauptgruppen (Aspartyl-, Serin-, Cystein-, Threonin- und Metallo-Proteasen), die anhand der chemischen Beschaffenheit ihres katalytischen Zentrums klassifiziert werden. Viele Proteasen werden mit dem Verlauf verschiedenster Krankheiten in Verbindung gebracht (Tab. 1.2), weshalb geeignete Inhibitoren als aussichtsreiche therapeutische Ansatzpunkte angesehen werden.^[55]

Hinweise über die Beschaffenheit von solchen geeigneten Inhibitoren liefern in aller Regel die natürlichen Substrate. Bei der Entwicklung von potentiellen Therapeutika gilt es allerdings, die peptidischen Strukturen auf ein Minimum zu reduzieren. Trotz ihrer großen Bandbreite an biologischen Eigenschaften haben peptidische Verbindungen den Nachteil einer geringen Bioverfügbarkeit und eines schlechten pharmakologischen Profils, weshalb sie als effektive und nützliche neue Wirkstoffe nur selten in Frage kommen. Trotzdem läuft das *substrate based drug design* traditionell über die Optimierung von Peptidmolekülen, deren zu spaltende *cleavable*

bond durch ein so genanntes *noncleavable isostere* ersetzt wird. Die erfolgreiche dreidimensionale Strukturaufklärung vieler Enzyme der letzten Jahre ermöglicht mehr und mehr die Kombination mit einem *receptor based drug design* zur Verbesserung der Leitstrukturen und der Entwicklung von neuen Protease-Inhibitoren.

Protease	Funktion	Krankheit
HIV-1-Protease	HIV-Replikation	AIDS
Renin	Erzeugung von Angiotensin I	Bluthochdruck
Thrombin	Blutgerinnung	Schlaganfall
Tryptase	Phagocytose	Asthma
C5/C3 Konvertase	Komplement-Aktivierung	Entzündungen
Cathepsin K	Knochenresorption	Osteoporosis
Rhinovirus 3C Protease	Virale Replikation	Erkältung
ACE	Erzeugung von Angiotensin II	Bluthochdruck
MMPs	Rekonstruktion der zellulären Matrix	Entzündungen, Krebs
TACE	Freisetzung von TNF- α	Arthritis, Multiple Sklerose

Tabelle 1.2. Beispiele von Proteasen, ihrer Funktion und Einfluss auf eine Erkrankung.^[55]

Im aktiven Zentrum von Aspartylproteasen befinden sich zwei Asparaginsäuren, mit deren Hilfe polypeptidische Substrate, die im Allgemeinen aus 6-10 Aminosäuren bestehen, gebunden werden. Viele Aspartylproteasen besitzen außerdem eine oder mehrere so genannte „Flap“-Regionen, die den Inhibitor bzw. das Substrat in das aktive Zentrum drängen, weitere Wechselwirkung mit ihm eingehen und somit Basis für eine höhere Selektivität sein können.^[55] Wie ein Scharnier bringt die „Flap“ das Enzym nach der Substratbindung von dem offenen in einen geschlossenen Zustand, wodurch das Substrat festgehalten und für die Proteolyse ausgerichtet wird.^[56]

Die meisten Proteasen sind außerdem sehr sequenzspezifisch, d.h. die Größe hydrophober bzw. hydrophiler Bereiche des aktiven Zentrums definieren mögliche Bindungsstellen mit Aminosäureresten von polypeptidischen Substraten. Eine Standardnomenklatur benennt diese entsprechenden Substrat/Inhibitor-Seitenketten (z.B. P₃, P₂, P₁, P₁', P₂', P₃'), die mit den korrespondierenden Enzym-„Subsites“ (z.B.

$S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3'$) in Wechselwirkung treten können.^[55] Viele der Proteasen binden ihre Substrate bzw. Inhibitoren als gestreckte- bzw. als β -Faltblatt Strukturen, so dass das meist peptidische Rückgrat linear aufgezeichnet wird und an diesem die jeweiligen Bindungsbereiche markiert werden (Abb. 1.6).

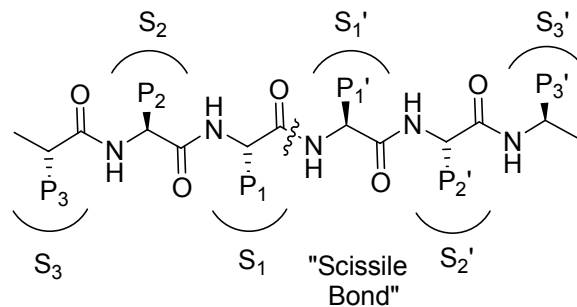


Abbildung 1.6. Standardnomenklatur für Substratreste und entsprechende Enzymbindungsstellen.

Die natürlichen Substrate der Aspartylproteasen werden im aktiven Zentrum über einen Säure-Base-Mechanismus hydrolysiert (Abb. 1.7).

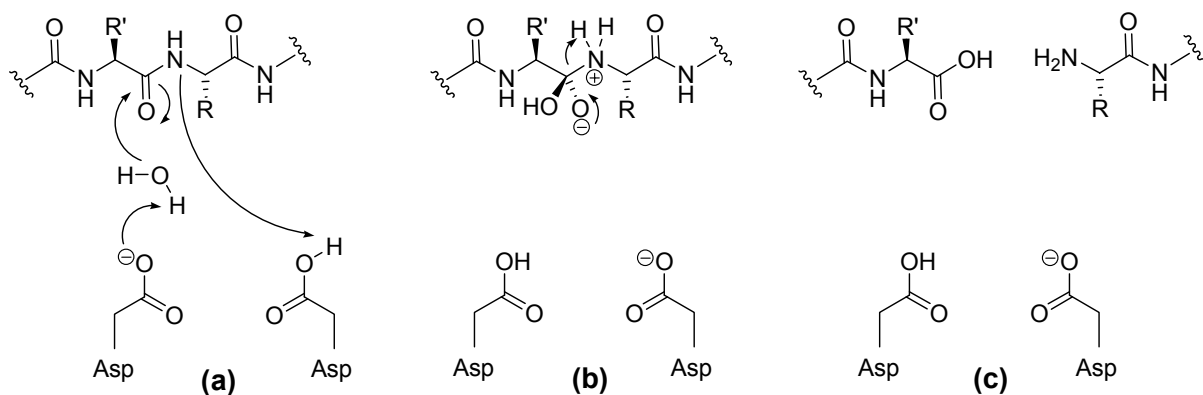


Abbildung 1.7. Säure-Base-Mechanismus der Hydrolyse von Peptiden durch Aspartylproteasen. Dabei wird die zu spaltende Bindung (*scissile bond*) nukleophil von einem Wassermolekül angegriffen, welches seinerseits durch einen deprotonierten Asparaginsäurerest aktiviert wird (a). Die protonierte Asparaginsäure wiederum überträgt ein Proton auf den Stickstoff der Amid-Bindung und generiert auf diese Weise einen zwitterionischen Übergangszustand (b), welcher zerfällt und die gespaltenen Produkte freisetzt (c).

Die meisten der bis heute entwickelten Aspartylprotease-Inhibitoren stehen über nicht-kovalente Bindungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindung, van-der-Waals Bindung) mit dem Enzym in Wechselwirkung. Es handelt sich dabei folglich um reversible Inhibitoren, deren Effektivität von der Affinität zum Enzym abhängt. Ein Ansatz der bei der Entwicklung solcher Inhibitoren erfolgreich angewendet wird, ist

die zu spaltende Bindung (*scissile bond*) durch eine von dem Enzym nicht-spaltbare (*non-cleavable scissile bond*) Bindung zu ersetzen. Solche Übergangszustand-Isostere sind vergleichbar mit der tetraedrischen Zwischenstufe (Abb. 1.7b) der Hydrolyse von Amid-Bindungen, zeichnen sich aber dadurch aus, dass sie selbst nicht hydrolysiert werden können. Es wird angenommen, dass Verbindungen mit solchen „Nachahmungen“ der Zwischenstufe viel stärker an das Enzym binden als die entsprechenden natürlichen Substrate. Einige solcher *transition-state isosteres* sind in Abb. 1.8 dargestellt.

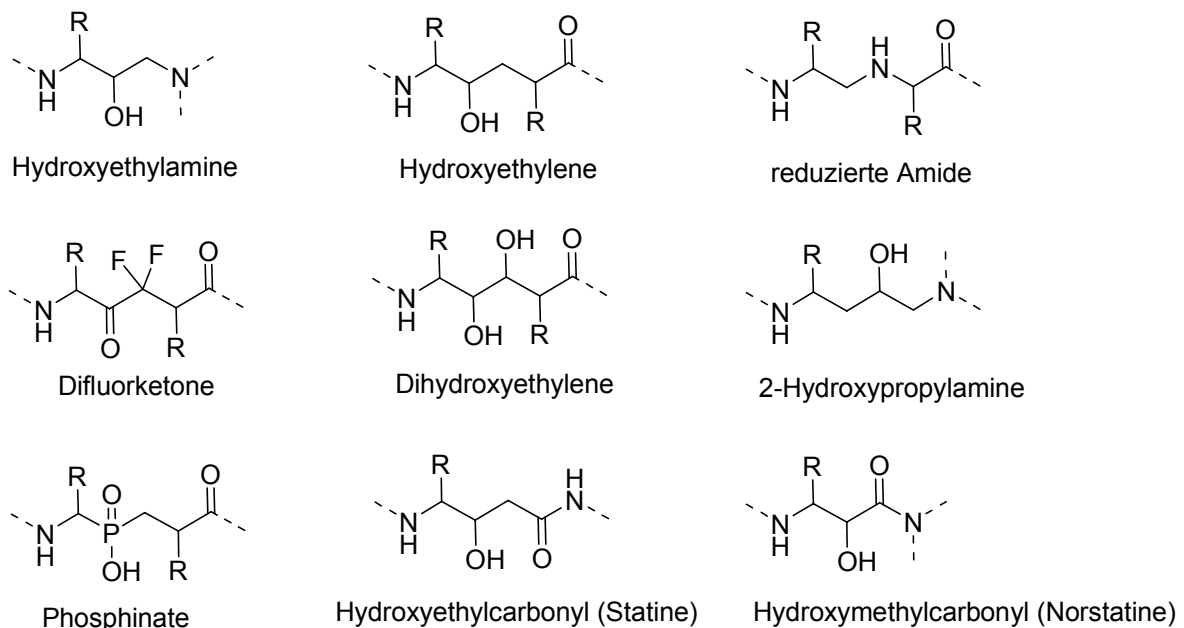


Abbildung 1.8. Strukturen der am häufigsten verwendeten *transition-state isosteres*.

1.5.2.1 Die β -Sekretase (BACE)

Das Verständnis der Etiologie von Morbus Alzheimer erlebte in den letzten Jahren einen enormen Fortschritt. Von großer Bedeutung war dabei die Identifizierung und Charakterisierung des Enzyms β -Sekretase (*β -Site APP cleaving enzyme*, synonym: BACE1, Asp2, Memapsin2), welchem eine Schlüsselposition in der Amyloid-Kaskade zugewiesen werden konnte.^[57-59] Lange Zeit galt das *amyloid precursor protein* (APP) als einziges natürliches Substrat der β -Sekretase, weshalb es das ideale Ziel einer Wirkstoffentwicklung zu sein schien. Mit der Entdeckung der *amyloid precursor-like proteins* (APLPs) sowie anderer Substrate (Sialyltransferase ST6Gal I, P-selectin *glycoprotein ligand-1* PSGL-1)^[60-62] geriet diese Annahme ins Wanken. Doch die

Möglichkeit, Kenntnisse der neuen Substrate in eine verbesserte Entwicklung von BACE-Modulatoren zu übernehmen, trug dazu bei, dass BACE1 eines der bedeutendsten *targets* in der Alzheimerforschung blieb.^[63]

BACE1 besteht aus 501 Aminosäuren und wird von 9 Exons codiert, die auf Chromosom 11 lokalisiert sind. Eine Transmembrandomäne (AS 461-477) verankert das Enzym mit der Zellmembran, weshalb es zu einer neuartigen Klasse Typ I transmembraner Aspartylproteasen gezählt wird. Der Großteil des Proteins wird von der Ektodomäne eingenommen, auf der sich die beiden potentiell aktiven Aspartatreste an den Positionen 93 und 289 befinden. BACE1 ist auf der Ebene der Proteinsequenz 30-37% homolog zu anderen Aspartylproteasen, wobei auch hier die Motive der aktiven Zentren hochkonserviert sind (-DTGS-, -DSGT-, Abb. 1.9).

Am *N*-terminalen Ende befindet sich eine Signalsequenz (AS 1-21), welche eine wichtige Funktion im sekretorischen Transportweg des Enzyms aus dem Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche übernimmt; ein Abschnitt von 24 Aminosäuren am C-terminalen Ende befindet sich im Cytosol.^[64]

BACE1 besitzt außerdem einen Propeptid-Abschnitt, der durch Furin oder furinähnliche Propeptidkonvertasen nach dem Erkennungsmotiv RXXR zwischen Position 45 und 46 abgespalten wird und im Reifungsprozess des Enzyms von entscheidender Rolle ist. Die Abspaltung des Propeptids löst scheinbar die korrekte Faltung der katalytischen Domäne aus.^[65] Es konnte allerdings gezeigt werden, dass BACE1 trotz Anwesenheit des Propeptids seine Enzymaktivität nicht verliert.^[66,67]

Genauso scheint die C-terminale Transmembrandomäne von BACE1 für die Aktivität nicht zwingend notwendig zu sein. Die Lokalisierung des Substrats APP und des Enzyms BACE1 in der gleichen Membran erhöht allerdings die Selektivität und Kinetik der Spaltung. Zur Reifung von BACE1 ist außerdem die Bildung dreier intramolekularer Disulfidbrücken notwendig (Cys₂₁₆/Cys₄₂₀, Cys₂₇₈/Cys₄₄₃, Cys₃₃₀/Cys₃₈₀). Durch Aufbau dieser Brücken scheint die extrazelluläre katalytische Domäne eine besondere Stabilisierung zu erfahren, aber genauso wie die Abspaltung des Propeptids scheinen auch die Disulfidbrücken nicht essentiell für die Aktivität des Enzyms zu sein.^[68]

Über die physiologische Bedeutung von BACE1 war lange Zeit wenig bekannt. Eine Forschergruppe um Christian Haass konnte allerdings kürzlich nachweisen, dass BACE1 für die Myelinisierung und die korrekte Entwicklung von Neuronen des peripheren Nervensystems unerlässlich ist.^[69] Das Myelin bewirkt, dass

Nervensignale schnell zum Gehirn weitergeleitet werden. Wird das BACE1-Gen blockiert, bildet sich diese Myelinschicht um die Nervenfortsätze nur unvollständig aus.

Durch eine Gen-Datenbanksuche konnte BACE2 als Homolog von BACE1 identifiziert werden. Auf Proteinebene zeigt BACE2 zu BACE1 eine 64%ige Übereinstimmung und die AS im Bereich der aktiven Aspartate sind hochkonserviert.^[60,70] BACE2 erkennt ebenfalls die „ β -site“ von APP, spaltet das Protein aber an den α -Sekretase-Stellen von Phe₁₉ und Phe₂₀, welche zu keiner vermehrten Bildung von A β -Ablagerungen führen. Außerdem zeigen Experimente mit einer Überexpression von BACE2 keine erhöhten Werte einer A β -Produktion.^[71]

Während Kristallstrukturen von löslichem BACE der Ektodomäne mit hochpotenten Inhibitoren eine Monomerstruktur mit großer Ähnlichkeit zu anderen Aspartylproteasen zeigen, konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass BACE1 verankert in der Membran, wahrscheinlich als Dimer auftritt.^[72] Solange die Ektodomäne an die Zellmembran gebunden bleibt, kommt es zu einer Dimerisierung, wobei die cytoplasmatische Domäne und der Transmembranbereich dabei keine Rolle spielen.

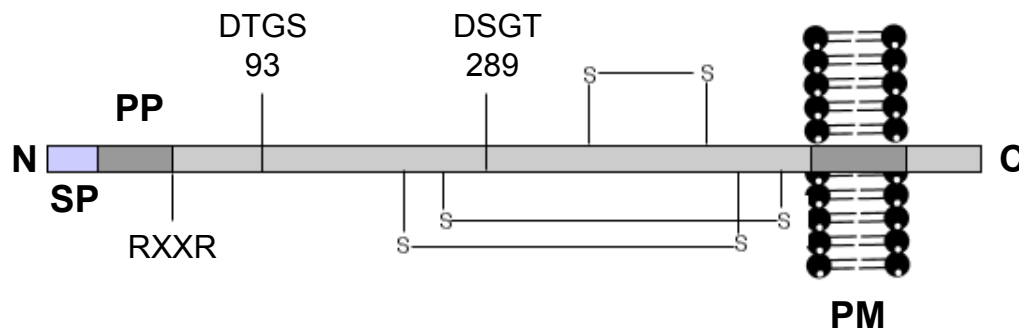


Abbildung 1.9. Schematische Darstellung von BACE. Hervorgehoben sind die aktiven Aspartate an Position 93 und 289. Die intramolekular verbundenen Cysteine sind durch schematische Disulfidbrücken dargestellt (Cys₂₁₆/Cys₄₂₀, Cys₂₇₈/Cys₄₄₃, Cys₃₃₀/Cys₃₈₀). SP: Signalpeptid, (AS 1-21); PP: Propeptid (AS 21-46); PM: Plasmamembran.

1.5.2.1.1 β -Sekretase-Inhibitoren

Evidenz für die Bedeutung von BACE1 als potentiell Ziel einer Wirkstoffentwicklung für die Alzheimersche Krankheit liefern Studien an transgenen Tiermodellen. Mäuse mit Deletion des BACE-Gens sind nicht in der Lage A β zu generieren, weder mit endogenem noch mit transgenem APP.^[73,74] Erstaunlicherweise zeigen Tiere aus

diesen Versuchen keine erkennbaren Anomalien, weshalb die Annahme gestärkt wird, dass eine anti-BACE-Therapie ohne nennenswerte Nebenwirkungen ablaufen könnte. Eine neuere Studie beschreibt allerdings Verhaltensstörungen von BACE *knock-out* Mäusen.^[75] Welche konkreten Auswirkungen dies für eine mögliche Therapie haben könnte, kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Einfache *high-throughput fluorescence-based peptidhydrolysis assays* konnten für die Identifizierung erster Leitstrukturen genutzt werden, ohne dabei aber den genauen Mechanismus der Inhibition zu kennen.^[76,77]

Enorme Fortschritte machte das BACE-Inhibitor-Design durch Arbeiten von Tang (Oklahoma Medical Research Foundation) und Gosh (Universität von Illinois), die eine substratbasierte Strategie wählten. Ausgehend von der bevorzugten Spaltungssequenz der schwedischen Mutante von APP ersetzten sie die zentralen P₁/P₁'-Reste durch ein nicht-hydrolysierbares „Homostatin Isoster“. Weitere Veränderungen an beiden Seiten des Homostatin-Kerns führten letztendlich zur Entwicklung von Penta- bzw. Hexapeptid-Inhibitoren und OM99-2 (**7**) mit K_i –Werten von 36 bzw. 1.6 nM (Abb. 1.10). Die hohe Affinität von OM99-2 zu BACE1 ermöglichte die erste erfolgreiche Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse (PDB: 1FKN, Abb. 1.11),^[78,79] was wiederum strukturbasierende Modifikationen vorantrieb. Resultat dieser Entwicklungen waren u.a. die Synthese des hoch potenten BACE-Inhibitors OM00-3 (**8**, K_i = 0.31 nM) sowie die Kenntnis bevorzugter Interaktionen von einzelnen Bereichen des aktiven Zentrums.

OM99-2 und OM00-3 besitzen beide ein Hydroxyethylen-Zentrum, welches über vier Wasserstoffbrückenbindungen an die katalytisch wirksamen Asparaginsäuren von BACE koordiniert. Aminosäurereste an der P₄-Stelle interagieren möglicherweise mit Arg₂₃₅ und Arg₃₀₇ des aktiven Zentrums, während die Seitenketten von Leu oder Val für die schmale hydrophobe S₃-Tasche geeignet erscheinen. Der BACE1-S₂-Bereich besteht aus einer hydrophilen *pocket*, welche vorzugsweise durch die Reste der AS Asp, Asn oder Met erfüllt wird. Eine der Positionen mit der wenigsten Variabilität ist die S₁-Stelle des Enzyms. Nahezu alle bekannten Inhibitoren besitzen dort einen Leu-Rest, lediglich Phe- oder Met-Seitenketten tauchen als Alternative auf.

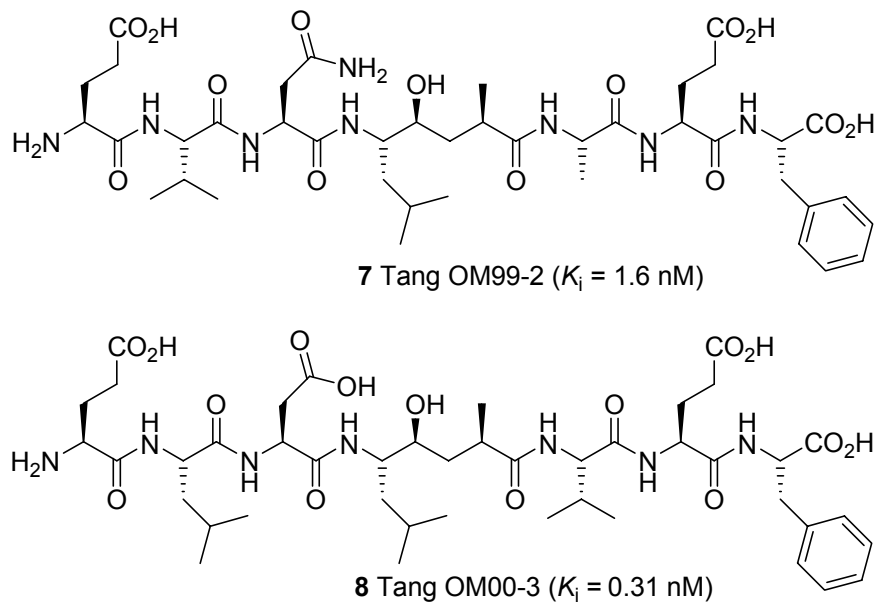


Abbildung 1.10. Strukturen der hoch potenten BACE-Inhibitoren OM99-2, OM00-3.

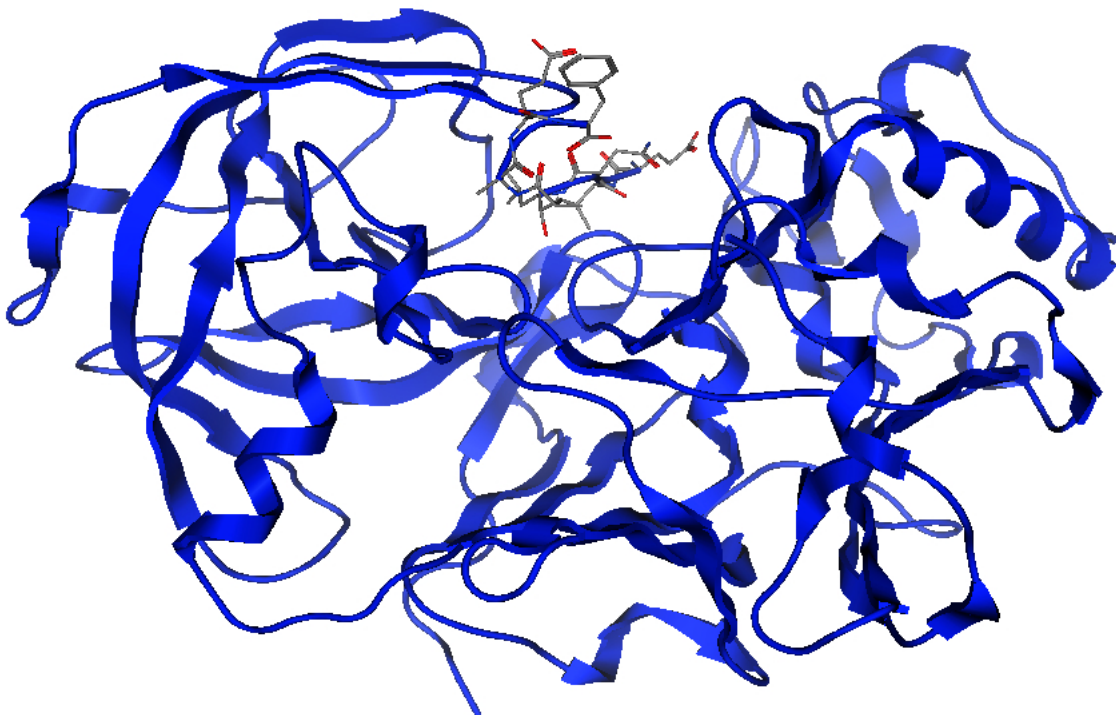


Abbildung 1.11. Kristallstruktur von BACE komplexiert mit OM99-2 (PDB: 1FKN).

Die Enzymseite mit den S₁'- bis S₄'-Taschen zeigt weniger Einschränkungen in der Wahl des Interaktionspartners. Gruppen an P₃' und P₄' gehen sogar nur eine geringe

Wechselwirkung mit dem Enzym ein, so dass sie oft ignoriert werden können, um das Molekulargewicht des potentiellen Inhibitors zu reduzieren.

Die von Tang und Gosh synthetisierten Inhibitoren besitzen in ihrem Zentrum jeweils ein Hydroxyethylen-Motiv, welches als nicht hydrolysierbare „Nachahmung“ der Zwischenstufe funktioniert. Die verschiedensten anderen *transition-state isosteres* wurden mit mehr oder weniger Erfolg von anderen Gruppen und Firmen auf ihre BACE-Tauglichkeit untersucht. Trotz dieser Erfolge und Anstrengungen bei der Entwicklung von BACE1-Inhibitoren blieben bis ins Jahr 2003 zwei große Hürden der Wirkstoffentwicklung völlig unberücksichtigt: Das Potential zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und die orale Bioverfügbarkeit. Peptidische Inhibitoren zeigen zwar eine große Selektivität, als pharmakologisch interessante Wirkstoffe kommen sie jedoch selten zur Anwendung.

Einen ersten Schritt zu Inhibitoren mit einem geringeren peptidischen Charakter machte Elan durch Einführung von Isophthalamiden in Verbindung **9** (Abb. 1.12). Durch erfolgreiche Co-Kristallisation konnte gezeigt werden, dass dieser Rest ideal mit dem S₂/S₃-Bereich des Enzyms interagiert. Annähernd tausend Derivate dieses Motivs mit verschiedensten Isosterengruppen wurden seither in der Patentliteratur gesichert. Eine kleine Überraschung hielt die Kristallstruktur allerdings noch bereit. Der Alkohol der Isosteren-Gruppe besitzt eine *R*-Konfiguration, eine Tatsache die völlig konträr zu den bis dahin beobachteten BACE-Inhibitoren ist. Das sekundäre Amin und der sekundäre Alkohol erkennen die Asparaginsäuren des aktiven Zentrums in einer völlig unüblichen Weise. Das benachbarte Amin erhält scheinbar ein Proton von Asp₂₂₈ und platziert seinen 3-Methoxy-Benzylsubstituenten in die S₂'-Tasche. Eine der *N*-Propylgruppen des Isophthalamides besetzt den S₃-Bereich und zeigt zum Phenylring, der mit der S₁-pocket interagiert.

Wissenschaftler von MSD gelang durch Anwendung eines neuartigen *high throughput screening* (HTS) Verfahrens die Identifizierung einer 1,3,5-trisubstituierten aromatischen Verbindung (**10**, Abb. 1.12). Es handelt sich dabei um eine Aminopentyloxaacetamid-Klasse mit moderater BACE1-Aktivität (IC₅₀ = 1–25 µM). Untersuchung eines Enzym/Inhibitor-Komplexes, welcher durch Co-Kristallisation gewonnen werden konnte, zeigte die Interaktionen der Verbindung mit den S₄- und S₁-Bereichen des aktiven Zentrums von BACE1. Es konnten keinerlei Wechselwirkungen mit der S₁'-S₃'-Positionen des Enzyms festgestellt werden und was noch verwunderlicher erschien, die Verbindung hat keinerlei direkten Kontakt mit

den katalytischen Asparaginsäuren. Der 4-Fluorphenyl-Rest orientiert sich zur S_3 -Tasche von BACE1, von der man bislang wusste, dass sie eher Wechselwirkungen mit kleinen hydrophoben Gruppen bevorzugt. Die 4-Fluorphenyl-Gruppe kreiert auf diese Weise eine S_3 -*subpocket* (S_3^{sp}), die bislang so noch nicht beobachtet werden konnte. Eine weitere unübliche Eigenschaft betrifft die Aminopentylkette des Moleküls. Anstatt Interaktionspartner für die *prime-side* des Enzyms zu sein, windet sie sich zurück und trifft die S_1 -Tasche. Eine Weiterentwicklung vorangetrieben durch diese Erkenntnisse, zielt darauf ab, durch Interaktionen mit den katalytisch wirksamen Asparaginsäureresten die Aktivität steigern zu können. Durch Verknüpfung eines Hydroxylamin-Motivs (**11**, Abb. 1.12) mit einem Isophthalamid-Rückgrates konnte tatsächlich die Aktivität verbessert werden ($IC_{50} = 11$ nM).

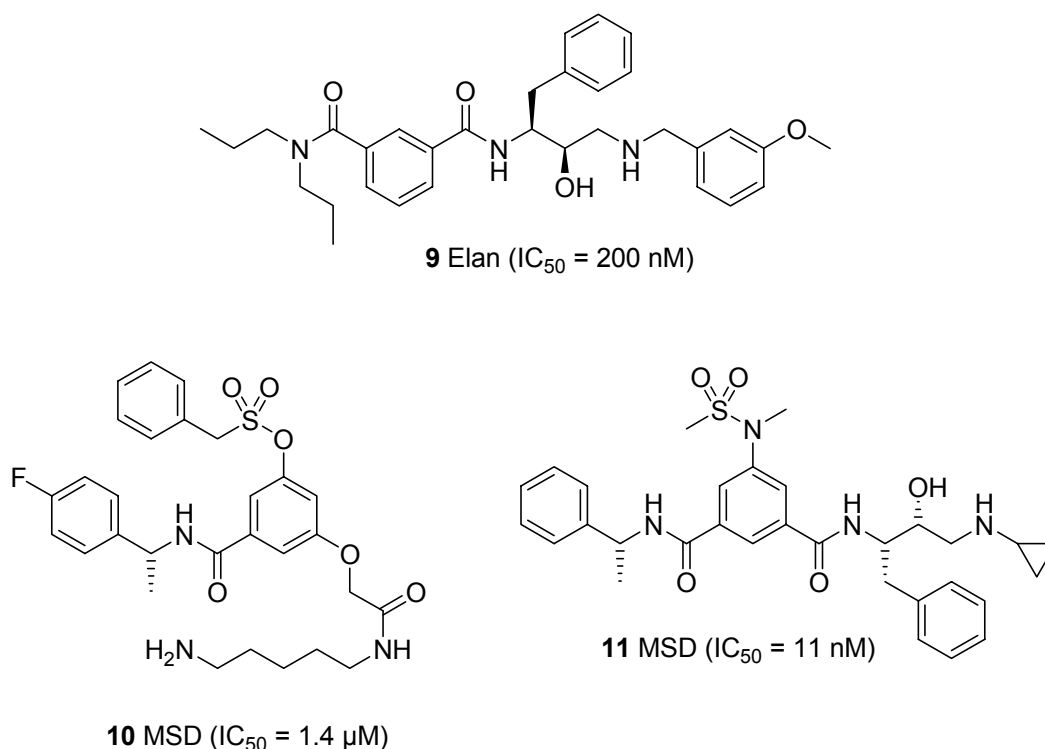


Abbildung 1.12. Nicht-peptidische BACE-Inhibitoren.^[79]

1.5.2.2 Die γ -Sekretase

Anders als bei der β -Sekretase blieb die Struktur der γ -Sekretase lange Zeit rätselhaft und die exakte Form ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Nach der Spaltung von APP durch BACE bzw. der α -Sekretase folgt eine unübliche Prozessierung der membrangebundenen Fragmente C99 bzw. C83 von der γ -

Sekretase an Stellen, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Diese Tatsache stellt die Strukturaufklärung vor große Schwierigkeiten und verhinderte bis heute eine erfolgreiche Kristallisation der γ -Sekretase.

Genmutationen von Presenilin1 (PS1) und Presenilin2 (PS2) beeinflussen die $A\beta_{42}$ -Produktion sowohl in transgenen Tiermodellen als auch im menschlichen Plasma in erheblichem Maße.^[81-84] Außerdem resultieren Versuche mit PS1/PS2 *knockout* Mäusen in einem völligen Verlust der γ -Sekretase-Aktivität, so dass ein direkter Zusammenhang zu den Presenilinen gezeigt werden konnte.

PS1 und PS2 sind homologe, polytope Transmembranproteine mit 10 hydrophoben Domänen (HD). Die favorisierte Auffassung, dass 8 dieser Bereiche in der Membran lokalisiert sind, wurde durch eine kürzlich erschienene Arbeit geringfügig korrigiert. Durch Einführung von Glykolisierungsstellen in PS1 konnte festgestellt werden, dass die Struktur wahrscheinlich aus 9 Transmembrandomänen (TM) besteht.^[85] Der N-Terminus befindet sich zusammen mit einer großen hydrophilen Schleife im Cytosol, wohingegen der C-Terminus entweder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im extrazellulären Bereich sitzt (Abb. 1.13).

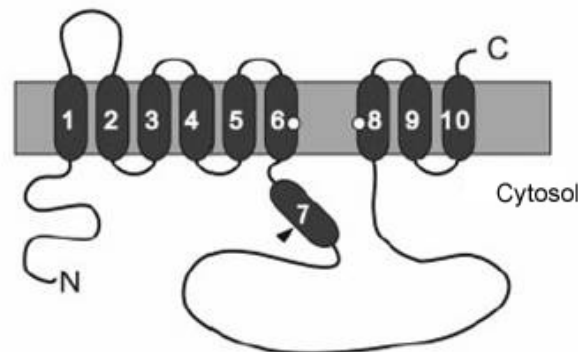


Abbildung 1.13. Modell für Presenilin1 mit einer 9-TM-Domäne, dem N-Terminus und der großen hydrophilen Schleife im Cytosol, sowie dem C-Terminus im Lumen oder extrazellulären Raum. Die beiden hellen Kreise auf der 6. und 8. TM-Domäne repräsentieren die katalytischen Aspartate (Asp₂₅₇ und Asp₃₈₅).^[85]

Verschiedene *transition-state* analoge Inhibitoren deuten darauf hin, dass es sich bei der γ -Sekretase um eine unübliche transmembrane Aspartylprotease handelt.^[86] Ersatz der Asparaginsäuren Asp₂₅₇ und Asp₃₈₅ in den TM-Domänen 6 und 8 und der daraus resultierende Verlust der Enzymaktivität verstärken diese Annahme.^[87]

Für eine γ -Sekretase-Aktivität sind neben dem PS als katalytische Untereinheit allerdings weitere Komponenten notwendig. Es scheint heute erwiesen, dass die γ -

Sekretase ein Proteinkomplex mit hohem Molekulargewicht ist, welcher aus den Untereinheiten PS1 oder PS2, Nicastrin, Aph-1 (*anterior pharynx defective 1*) und PEN-2 (*presenilin enhancer-2*) besteht.^[88-92] Die Preseniline allein sind nicht ausreichend für eine enzymatische Aktivität.^[86,93] Komplexbildung und die Funktion der einzelnen Komponenten sind noch weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass die einzelnen Komplexkomponenten sich gegenseitig in ihrer zellulären Expression beeinflussen. Überexprimierte Einzelkomponenten sind nicht stabil (PEN-2, PS) oder maturieren nicht, wie im Falle von Nicastrin.^[94]

Neben APP sind auch eine Reihe weiterer Substrate bekannt, die von der γ -Sekretase gespalten werden, weshalb sie auch als Proteasom der Membran bezeichnet wurde.^[95] Als potentiell Ziel einer Wirkstoffentwicklung birgt dies natürlich die große Gefahr möglicher Nebenwirkungen. Die enge Verwandtschaft zur Notch-Signalkaskade, welcher in der embryonalen Entwicklung von essentieller Bedeutung ist, lässt die γ -Sekretase als sehr riskantes und anspruchsvolles *drug target* erscheinen. Die intrazelluläre Tätigkeit des Membranrezeptors Notch in den Neuronen des menschlichen Zentralnervensystems wird durch die Anwesenheit von PS1-Inhibitoren stark reduziert, was dramatische Folgen für die Morphologie der Nervenzellen hat. Von großer Bedeutung und Schwierigkeit wird es deshalb sein ein therapeutisches Fenster zu finden, in dem ein potentieller γ -Sekretase-Modulator ausreichende Effektivität aber keine unerwünschte Toxizität zeigt.^[96]

1.5.2.2.1 γ -Sekretase-Inhibitoren

Die Entwicklung von potenten γ -Sekretase-Inhibitoren wird stark geprägt durch die beschriebenen Eigenschaften des Proteinkomplexes. Eine Kristallisation ist erschwert, die unverzügliche Röntgenstrukturanalyse wird somit undenkbar, Vorstellungen über die räumliche Anordnung und Ausmaße der „Bindungstasche“ des Enzyms sind nur vage vorhanden. An eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung ist somit kaum zu denken. Dennoch sind bis heute viele nicht-peptidische sowie peptidische Strukturen von verschiedenen Firmen in Patenten gesichert worden.

Peptidische PS1-Inhibitoren wie L-685,458 (**12**, IC_{50} = 17 nM, Abb. 1.14) von Merck Sharp & Dohme (MSD) zählen dabei zu den potentesten.^[97,98] Hydrophobe Di- und Tripeptide mit sperrigen *N*-terminalen Schutzgruppen sind bekannte Strukturtypen für die Inhibition der γ -Sekretase. Sie wirken allerdings sehr unspezifisch und sind

genauso potente Serin- bzw. Cysteinprotease-Inhibitoren. Als Werkzeug für die Assay-Entwicklung oder als Markierungsbestandteil haben sie trotzdem eine breite Anwendung und einen großen Nutzen.^[86,99-104]

Aus einer HTS-Leitstruktur entwickelte Elan den semi-peptidischen γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (**13**, IC_{50} = 20 nM, Abb. 1.14). Anhand von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) stellte sich heraus, dass der Phenylglycinrest und der Difluorphenylelessigsäurebaustein entscheidend zur Aktivität der Verbindung beitragen.^[105,106] Subkutane Gabe von DAPT bei Mäusen in relativ hohen Mengen (100 mg/kg) hatte eine 50%ige Reduktion des kortikalen A β -Niveaus innerhalb von 3 Stunden zur Folge. Eine 40%ige Erniedrigung konnte bei oraler Verabreichung derselben Menge beobachtet werden. Auf den ersten Blick erscheinen diese Zahlen sehr vielversprechend, allerdings wurde in der Arbeit über keinerlei A β -Gehirnlevels berichtet.^[107] Außerdem konnte in weiteren vorklinischen Studien gezeigt werden, dass DAPT in viel höherem Maße auch den „Notch *pathway*“ beeinträchtigt (100 – 1000 mal stärker), so dass eine hohe *in vivo* Toxizität zu beobachten ist.^[108,109]

Umfassende *in vivo* Analysen wurden auch mit LY-411575 (**14**, IC_{50} < 1 nM, Abb. 1.14), einer Weiterentwicklung von DAPT, durchgeführt. Die stereoselektive Einführung einer Hydroxylgruppe und die starre räumliche Anordnung zweier Phenylreste in einem Caprolactam-Motiv erhöhten die Aktivität auf ca. 1 nM. Durch orale Verabreichung von 1 mg/kg bei drei bis fünf Monate alten Tg2576 Mäusen halbierte LY-411575 den Plasmaspiegel sowie das kortikale A β -Niveau innerhalb von 3 Stunden.^[110] Eine Studie, in der ein weniger aktives Diastereomer transgenen Mäusen über 15 Tage oral verabreicht (1-10 mg/kg pro Tag) wurde, beschreibt allerdings neben der Reduktion des A β -Niveaus ein Auftreten von Atrophie des Thymus sowie einen Verfall des intestinalen Epithels bei den Versuchstieren.^[111] Die Notch/APP-Selektivität wurde in zellulären Assays bestimmt: $IC_{50}(A\beta_{40})$ = 0.082 nM, IC_{50} (Notch) = 0.39 nM. Trotz der teils sehr hohen Aktivitäten zeigt dieses schmale Toxizitätsfenster die limitierte Möglichkeit, Verbindungen des DAPT-Strukturtyps für erfolgreiche klinische Studien einzusetzen. Die Suche nach neuen Strukturen mit einer höheren APP-Selektivität scheint dennoch unumgänglich.

DuPont Pharmaceuticals entwickelte eine weitere potente Difluorphenacyl-caprolactam-Verbindung (**15**, IC_{50} = 0.3 nM, Abb. 1.14), die allerdings sehr an die Struktur von DAPT erinnert.^[112] DuPont wurde zwischenzeitlich von Bristol-Meyers Squibb übernommen, die diesen Strukturtyp weiterentwickelten und eine große

Anzahl von Verbindungen präsentierten, letztlich alle mit dem Ziel, die Patente von Elan zu umgehen und zu erweitern. Die Struktur des Oxazolylsulfonamides (**16**, Abb. 1.14) sei als ein Beispiel genannt.^[19]

Grosses Interesse galt in der nahen Vergangenheit Synthesen von γ -Sekretase-Inhibitoren mit einem besseren pharmakologischen Profil als das der DAPT-Verbindungen. Im Fokus standen vor allem Verbindungen, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke, eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf, besser zu überwinden. Die Blut-Hirn-Schranke dient dazu, Milieubedingungen im Gehirn aufrecht zu erhalten und sie von denen des Blutes abzugrenzen. Eine bessere Verfügbarkeit für das Zentralnervensystem ermöglicht eine niedrigere Dosierung und senkt die effektive Konzentration der potentiellen Wirkstoffe in der peripheren Umgebung, was wiederum eine Reduzierung von möglichen Nebenwirkungen zur Folge hat. Als Strategie ist die Verknüpfung von Inhibitoren mit einem so genannten *redox chemical delivery system* (RCDS) seit längerem bekannt.^[113,114] Der Wirkstoff wird mit einem hydrophoben Dihydropyridin-Träger verbunden, welcher den schnellen Transfer über die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Einmal im Gehirn-Parenchym angelangt, wird das Dihydropyridin enzymatisch zum entsprechenden Pyridiniumsalz oxidiert. In dieser Form hat es zum einen den Effekt, dass die Substanz schneller durch die Nieren und Galle abgebaut wird, zum anderen sorgt der geladene Zustand dafür, dass die Verbindung im Gehirn verbleibt und nicht wieder über die Blut-Hirn-Schranke zurück ins Blut gelangt. Ein Thiazolamid- γ -Sekretase-Inhibitor (**17**, $IC_{50} = 0.2 \mu M$, Abb. 1.14) wurde mit diesem Ziel synthetisiert.^[115] Es konnte gezeigt werden, dass Verbindung **17** nach 30 Minuten dreifach besser die Blut-Hirn-Schranke überwindet als eine entsprechende Verbindung ohne den RCDS-Rest.

Torrey Pines Pharmaceuticals beschrieben kürzlich eine Vielzahl weiterer Aminothiazol-Derivate mit interessantem Strukturtyp (Verbindung **18**, Abb. 1.14).^[116] Ungefähr 60 ihrer patentierten Verbindungen zeigen eine sehr gute Aktivität ($IC_{50} < 0.2 \mu M$). Verbindung **19** (Abb. 1.14), die den gleichen Strukturtyp besitzt, kann diese Befunde bestätigen.^[80]

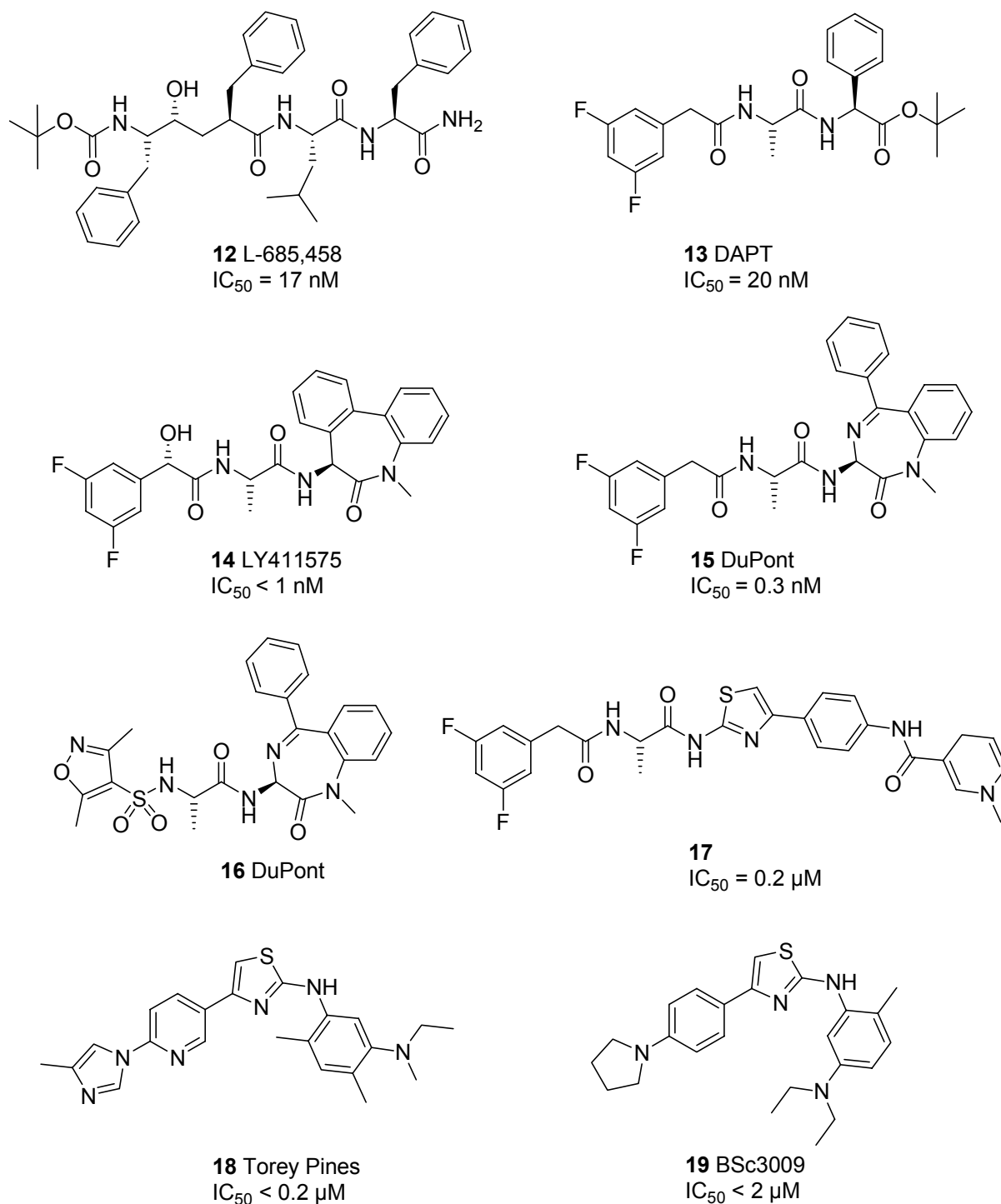


Abbildung 1.14. γ -Sekretase-Inhibitoren.^[80]

1.5.3 Das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau

Ein charakteristisches Merkmal in Gehirnen von Alzheimerpatienten ist die Bildung von so genannten Neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, NFTs). Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Anhäufungen abnormer Filamente in den

Nervenzellen. Hauptkomponente ist das in pathologischer Weise veränderte Tau-Protein, ein neuronales Mikrotubuli assoziiertes Protein.

Tau ist ein mittelgroßes Protein, das in seiner längsten Variante 441 Aminosäuren beinhaltet. Sechs Isoforme des Proteins sind im menschlichen Gehirn bekannt, die durch alternatives Splicing eines einzelnen auf Chromosom 17 lokalisierten Gens zustande kommen.^[117] Tau ist ein in höchstem Grade wasserlösliches Protein. Seine Sequenz wird von hydrophilen Aminosäuren bestimmt. Es besitzt einen sehr geringen Anteil von Sekundärstrukturelementen in Lösung und es ist außerordentlich resistent gegen Hitze und Säure.^[118]

Tau zählt zu den Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAPs), welche über mehrere so genannte Mikrotubulin-Bindungs-Domänen an die Mikrotubuli binden. Mikrotubuli sind ringförmige, 24 nm dicke Filamente des Cytoskeletts, die aus α - und β -Tubulindimeren bestehen. Sie sind bei dem Zellteilungsmechanismus involviert und Bestandteil des intrazellulären Transportsystems. Die physiologische Rolle der MAPs ist es, die Mikrotubuli zu stabilisieren und die Tubulin-Dimerisierung im Gehirn zu stimulieren.^[119,120] Tau ist meist im Bereich des Axons lokalisiert. Im Soma ist es geringer vorhanden und in den Dendriten gar nicht zu finden.^[121]

Die Stabilität der Mikrotubuli wird maßgeblich durch die MAPs beeinflusst. Eine Veränderung von Tau nimmt somit auch großen Einfluss auf die Zellfunktion der Mikrotubuli. Während der Alzheimer-Demenz (AD) bleibt Tau nicht länger an die Mikrotubuli gebunden. Trotz seiner Eigenschaften kommt es dazu, dass sich mehrere Tau-Proteine zusammenlagern, so genannte *paired helical filaments* (PHFs) oder *straight filaments* bilden, welche letztendlich zu den Neurofibrillären Bündel anwachsen. Neben der AD sind viele weitere Krankheiten bekannt, die diese Tau-Histopathologie aufzeigen. Im Unterschied zur AD besitzen sie allerdings keinen Hinweis auf eine Beteiligung von APP, A β oder den Presenilinen, so dass diese Krankheiten als *non-AD tauopathies* zusammengefasst werden.^[122] Lange Zeit galt die Tau-Pathologie weniger bedenklich als die der APP-Prozessierung, da sie innerhalb der Neuronen stattfindet. Ein genetischer Zusammenhang war außerdem nur für die A β -Plaques-Bildung bekannt. Mit der Entdeckung der Beteiligung Taus in verschiedenen Formen der familiären Frontotemporalen Demenz (FTDP-17) scheint auch die Bedeutung der Neurofibrillären Bündel in der Alzheimer-Kaskade endlich die entsprechende Aufmerksamkeit erlangt zu haben.

1.5.3.1 Die Bedeutung der Phosphorylierung

Der exakte Mechanismus, der zur Bildung der Neurofibrillären Bündel führt, ist nach wie vor ungeklärt. Verschiedenste post-translationale Veränderungen von Tau wie z.B. Glykosylierung und Phosphorylierung konnten allerdings bei Alzheimerpatienten nachgewiesen werden und scheinen von entscheidender Bedeutung für das Entstehen der Krankheit zu sein.^[123,124]

Die Affinität von Tau zu den Mikrotubuli ist erheblich vom Grad der Phosphorylierung abhängig, d.h. ab einem gewissen Maße der Phosphorylierung löst sich Tau von den Mikrotubuli, womit diese zerfallen. Abgelöstes Tau wiederum ist zur Bildung von intrazellulären Ablagerungen in der Lage, welche nach der Tau-Hypothese für den Verlust von Nervenzellen verantwortlich gemacht werden.^[125] Erklärungsversuche für die Bildung der Tau-Aggregate stützen sich deshalb oft in den Ursachen der Hyperphosphorylierung, welche allerdings sehr kontrovers diskutiert werden.^[122] Zum einen werden der Phosphorylierung Schlüsselfunktionen im Frühstadium zugewiesen, zum anderen bestehen aber auch Hinweise, dass eine Phosphorylierung von Tau keinen Einfluss auf die Aggregation nimmt bzw. diese sogar verzögert oder verhindert.^[126] In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des Carboxy-Endes des Proteins eine stimulierende Wirkung für die Aggregation hat, während eine Phosphorylierung in Nähe der Mikrotubulin-Bindungs-Domänen sich eher hemmend auf die Polymerisierung auswirkt.^[127,128] Eine Studie an Winterschlaf-haltenden Tieren geht sogar so weit, dass sie der Tau-Phosphorylierung eine wichtige physiologische Rolle zuschreibt. Hyperphosphorylierung von Tau erhöht die neuroprotektive Plastizität von Neuronen und schafft eine Resistenz gegenüber dem Abbau von Proteasen.^[129] Unabhängig von der Rolle die eine Tau-Phosphorylierung in der Alzheimerkaskade übernimmt, das Verhindern einer Tau-Aggregation bzw. das Auflösen von vorhandenen Tau-Zusammenlagerungen bleibt von großem Interesse für eine entsprechende Wirkstoffentwicklung.

1.5.3.2 Tau-Aggregation *in vitro*

Momentan sind ca. 22 verschiedene Krankheiten bekannt, in welchen eine Veränderung der Sekundärstruktur eines Proteins entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt. Unter ihnen sind fünf (Creutzfeldt Jakob Krankheit, Huntingtons Krankheit, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Frontotemporale Demenz), in welchen diese fehlerhafte „Umfaltung“ im Gehirn stattfindet. Die präzise Art und Weise wie ein üblicherweise unlösliches Protein seine Sekundärstruktur derart umgestalten kann, dass daraus stabile Polymere mit völlig anderen Eigenschaften entstehen, bleibt ungeklärt. Vereinheitlichte *in vitro* Modelle bieten die Möglichkeit, die Ursachen der Bildung von PHFs besser zu verstehen.

Die Rekonstruktion der Tau-Aggregation war zunächst von zwei grundlegenden Problemen bestimmt. Aufgrund der extrem hydrophilen Eigenschaft von Tau und der daraus resultierenden sehr geringen Aggregationstendenz war es schwierig, die Stufen der PHF-Bildung mit biochemischen bzw. spektroskopischen Methoden zu verfolgen. Außerdem bestanden Zweifel, ob *in vitro* Aggregate mit denen aus der Alzheimerschen Krankheit vergleichbar sind.

Mit der Entdeckung verschiedener Eigenschaften verlor das Problem der langsamen Aggregationsrate immer mehr an Bedeutung. Durch Wahl von geeigneten Tau-Domänen, die Region der Mikrotubulin-Bindungs-Domänen allein bildet z.B. wesentlich schneller PHFs als „normales“ Tau,^[130-132] und durch Addition gewisser Co-Faktoren wie z.B. Polyanionen (Heparin, Polyglutamat, Nukleinsäuren wie RNA) oder Fettsäuren konnte die Aggregationsgeschwindigkeit enorm gesteigert werden.^[133-137]

Die Interaktion mit Polyanionen führt im Tau-Molekül zu einer Änderung der meist im *random coil* vorliegenden Sekundärstruktur. In manchen Bereichen kommt es zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen. Es konnten zwei Hexapeptid-Motive in der zweiten und dritten Mikrotubulin-Bindungs-Domäne identifiziert werden, die ganz entscheidend an dieser Konformationsänderung mitwirken.^[138] Manche FTDP-17 Mutationen liegen z.B. innerhalb oder in unmittelbarer Nähe zu diesen Hexapeptiden (Δ K280, Abb. 1.15) und beschleunigen die PHF-Aggregation, indem sie die Neigung zu einer β -Faltblatt-Struktur erhöhen.^[139,140] Die Mikrotubulin-Bindungs-Domäne bildet folglich das Zentrum einer Tau-Faser im Rekombinant. Dies konnte genauso für Tau-Fasern in Gehirnen von Alzheimererkrankten gezeigt werden.^[141-143] Durch

Anwendung dieser Kenntnisse war man in der Lage zuverlässige Aggregations-Assays zu entwickeln.

Eine Arbeit von Pickhardt et al. beschreibt das Screening einer Bibliothek von 200.000 Substanzen.^[144] Durch Verwendung eines Fluoreszenz-Assays (basierend auf dem Farbstoff Thioflavin-S) war man in der Lage 1266 Verbindungen zu identifizieren, welche die Tau-Aggregation verhindern. 77 dieser Verbindungen sind überdies in der Lage, bestehende Aggregate wieder aufzulösen.

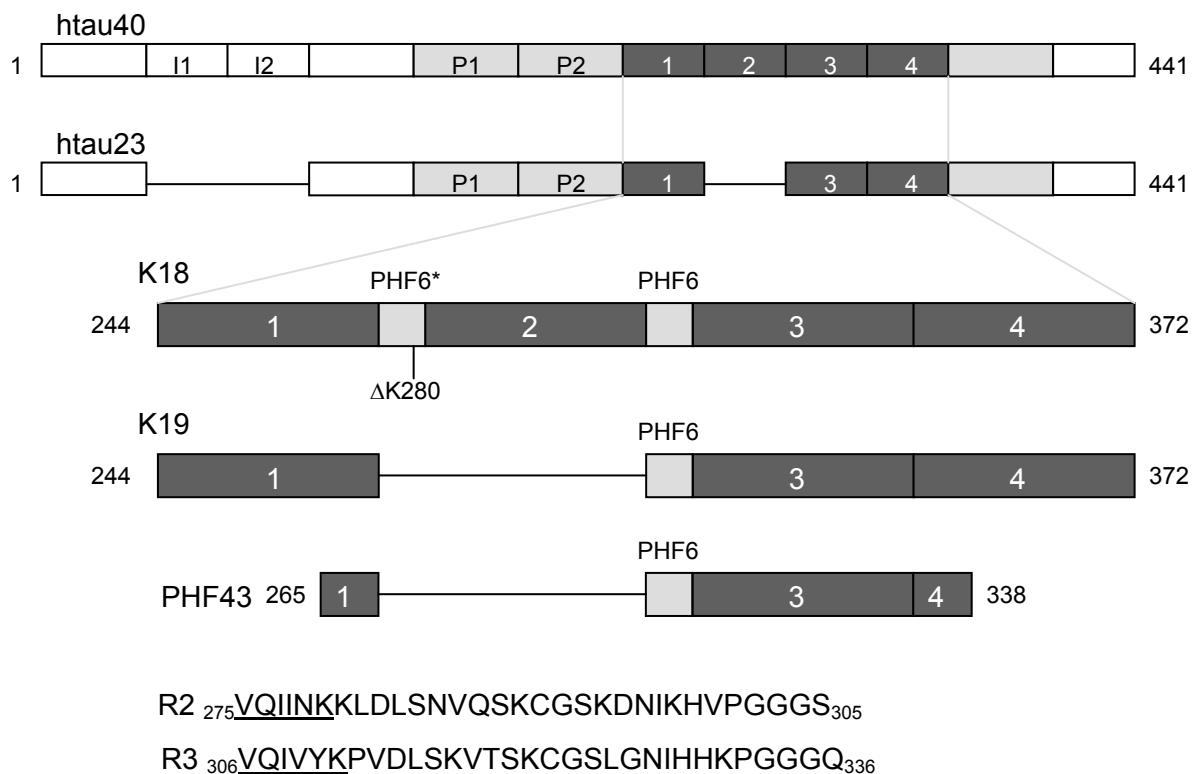


Abbildung 1.15. Modell und Isoform von Tau. Die Isoform htau40 ist die längste des menschlichen Zentralnervensystems (441 Aminosäuren). Sie enthält vier Mikrotubulin-Bindungs-Domänen aus 31 bzw. 32 Aminosäuren.^[117] Das Konstrukt K18 besteht lediglich aus den vier Mikrotubulin-Bindungs-Domänen, Konstrukt K19 aus drei. Das Peptid PHF43 erhält man durch Proteolyse von K19 mit der Endoprotease GluC. Die Sequenz der zweiten und der dritten Mikrotubulin-Bindungs-Domäne sind am unteren Ende der Abbildung dargestellt. Die beiden Hexapeptide PHF6 (V305-K311) und PHF6* (V275-K281) sind unterstrichen.^[145]

Während das von Pickhardt et al. beschriebene Assay auf Polyanionen als Co-Faktoren und oxidierenden Bedingungen beruht, entwickelten Binder und Mitarbeiter ein Aggregations-Assay, welches stattdessen Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) und reduzierende Bedingungen benötigt.^[136,137] Untersuchungen über die Unterschiede dieser beiden Aggregationsverfahren kamen zu dem Ergebnis, dass es ein

einheitliches Schema mit Prinzipien zur Bildung von PHFs gibt, dem beide folgen (Abb. 1.16).^[118]

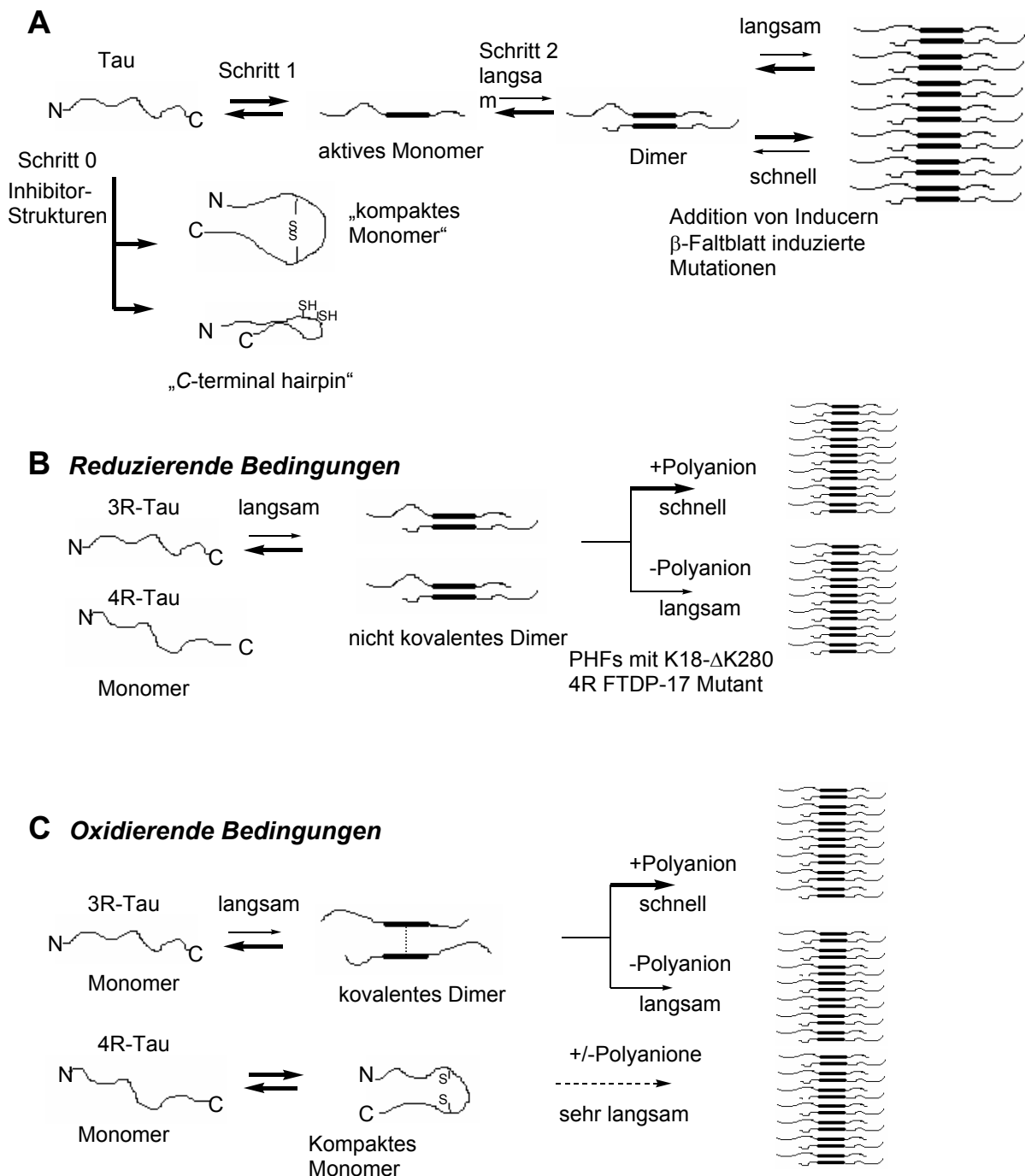


Abbildung 1.16. Mechanismus der *in vitro* Tau-Aggregation. (A) Verallgemeinerter Mechanismus. Schritt 1: Lösliches Tau hat eine vorwiegend als „Random Coil“ vorliegende Sekundärstruktur. Diese kann allerdings Konformationsänderungen vornehmen, wodurch Teile der Mikrotubulin-Bindungs-Domäne eine eher gestreckte Konformation annehmen (dargestellt als schwarzer Balken). Über diese sind Tau-Moleküle in der Lage β -Faltblatt-Wechselwirkungen mit anderen Tau-Molekülen einzugehen.^[138,139] Schritt 2: Zwei miteinander wechselwirkende Tau-Moleküle bilden ein Dimer (vermutlich durch eine β -Faltblatt-Formation um das Hexapeptid-Motive in der 2. (R2) und 3. (R3) Mikrotubulin-Bindungs-Domäne). Schritt 3: Weitere Tau-Monomere bzw. Dimere können zusammenlagern, wodurch sie einen Kern bilden, der letztendlich zu einer Filament-Struktur

anwächst. Schritt 0: Falls ein Tau-Molekül in einer „falschen“ Konformation vorliegt, kann es keine Aggregation vorantreiben, bzw. ist es vielleicht sogar in der Lage, diese zu inhibieren. Für natürliches Tau liegt das Gleichgewicht fast vollständig auf der Seite der Monomere; Dimere bilden sich lediglich in sehr geringen Mengen und die Aggregation ist unerheblich. Das Gleichgewicht kann allerdings auf die Seite der Aggregation verschoben werden, indem die Tau-Konzentration erhöht wird (z.B. durch Loslösen von den Mikrotubuli), durch Entfernen von N- oder C-terminalen Domänen von Tau (die Mikrotubulin-Bindungs-Domäne bildet den Kern der Aggregation), bei FTDP-17 Mutationen (erleichtern den Übergang zur β -Faltblatt-Struktur), durch Oxidation (wenn es zu stabilen Dimeren führt) oder durch Zugabe von Polyanionen oder Fettsäuren (diese verbessern die „Klebrigkeit“ von Tau, indem sie Ladungen kompensieren). (B), (C) Aggregation von 3R-Tau (Fragment K19) und 4R-Tau (K18) unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen: Unter den reduzierenden Bedingungen (B) sind die 3R und 4R Tau-Fragmente in der Lage zu einer Konformationsänderung und bilden nicht kovalente Dimere. Allerdings müssen Polyanionen anwesend sein, um die Reaktion zu einer Aggregation zu ermöglichen. Eine Ausnahme bildet das 4R-Tau mit einer Δ K280 Mutation, welche in der Lage ist, selbst ohne Anwesenheit von Polyanionen auf Grund ihrer erhöhten Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen PHF Aggregate zu bilden. Unter oxidierenden Bedingungen (C) ermöglicht die Bildung eines kovalenten Dimers bei 3R-Tau (C322) die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Aggregation. Die Reaktion kann durch Zugabe von Polyanionen weiter beschleunigt werden. Im Fall von 4R-Tau sorgt allerdings die intramolekulare Disulfid-Brücke dafür, dass Tau in einer „falschen“ Konformation verbleibt, weshalb die Aggregation nur sehr langsam bzw. fast gar nicht eintritt.^[118]

1.5.3.3 Tau-Aggregation *in vivo*

Von großer Bedeutung im Verständnis der Tau-Pathologie ist die Erforschung des Aggregation-Mechanismus. Wie kann ein normalerweise extrem lösliches Protein, dessen physiologische Bedeutung ist mit Mikrotubuli assoziiert zu sein und diese zu stabilisieren, seine Eigenschaften ablegen und einen polymeren, unlöslichen Zustand annehmen? Forschungserfolge der letzten Jahre geben eine immer genauere Antwort auf diese Frage, mit der Hoffnung, Methoden und Wege zu finden, die eine Bildung der Neurofibrillären Bündel verhindern bzw. rückgängig machen können.

Durch Entdeckung des monoklonalen Antikörpers Alz50 konnten zum ersten Mal so genannte *pretangles* nachgewiesen werden.^[146,147] Die amorphen Aggregate in den *pretangles* treten sowohl frei im Cytoplasma als auch assoziiert mit verschiedenen Zellorganellen auf.^[148] Bemerkenswert an dieser Entdeckung war vor allem, dass der Alz50-Antikörper nur an Tau bindet, wenn dessen Amino-Terminus in Kontakt mit der Mikrotubulin-Bindungs-Domäne tritt. Es kommt zu einer Veränderung der im natürlichen Tau vorliegenden *random coil*-Sekundärstruktur zu einer kompakteren „Alz50-Form“. ^[149] Weitere strukturelle Veränderungen führen zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen, welche durch β -Faltblatt sensitive Farbstoffe wie Thioflavin-S (ThS) oder Thiazin Rot nachgewiesen werden können. Erste Aggregate, die sich auf diese Weise anfärben lassen, sind mit Membranstrukturen assoziiert, weshalb angenommen wird, dass Veränderungen der Sekundärstruktur von Tau durch die

Interaktion mit intrazellulären Membranen und Organellen begünstigt wird.^[150] β -Faltblatt-Aggregate sind letztlich in der Lage, zu Neurofibrillären Bündel anzuwachsen.

Die in den *pretangles* vorliegende Alz50-Konformation von Tau tritt unter Umständen auch unverändert in den Neurofibrillären Bündel auf.^[151] Üblicherweise kommt es allerdings zu weiteren Konformationsänderungen. C- und N-terminale Kürzungen, ausgelöst durch die Einwirkung von Caspasen, bewirken die Modifizierung in eine nach dem Tau-66-Antikörper benannte Form, in welcher eine prolinreiche Region von Tau in Kontakt mit der MTBR tritt. Die Beteiligung ähnlicher Bereiche der MTBR in der Alz50 (AS 312-322) und in der Tau-66 (As 305-314) Konformation verhindert eine Coexistenz beider Strukturen im selben Molekül.^[152]

1.6 Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Lange Zeit galt die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) als fest verknüpft mit dem Glykogenstoffwechsel. Zunehmende Erkenntnisse in den letzten Jahren verdeutlichen allerdings ihre große Bedeutung in einer Vielzahl von Funktionen im menschlichen Organismus, weshalb sie auch als immer interessanteres *target* für eine Medikamentenentwicklung gegen eine Alzheimererkrankung angesehen wird.

GSK3 ist ein im Körper weit verbreitetes Enzym, das in einer besonders hohen Konzentration im Gehirn, speziell in den Neuronen, nachzuweisen ist. Man unterscheidet drei homologe Isoformen, GSK3 α , GSK3 β und GSK3 β -2. Die kürzeste Variante von ihnen, das GSK3 β -Protein, besteht aus 482 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa und ist zu 84% identisch mit der GSK3 α -Form. Die Gestalt von GSK3 ist relativ unspezifisch charakteristisch und kann mit anderen Kinasen verglichen werden. In besonders enger Verwandtschaft stehen die *cyclin dependent kinases* (CDK).

Nur sehr wenige andere Enzyme besitzen einen vergleichbaren breiten Einfluss auf zelluläre Vorgänge und Funktionen wie GSK3. Mehr als 40 Proteine sind bis heute bekannt, die von GSK3 phosphoryliert werden können (Tab. 1.3).^[153] Diese große Anzahl der vermeintlichen und bestätigten Substrate verdeutlicht das große Potential von GSK3, zeigt aber auch, dass die Aktivität von GSK3 sehr vorsichtig reguliert

werden muss. Verschiedenste Mechanismen sind für diese Feinregulierung der Aktivität von GSK3 von Bedeutung. Eine Phosphorylierung der Hydroxylgruppe des *N*-terminalen Ser₉ (GSK3 β) bzw. der Ser₂₁ (GSK3 α) reduziert die Enzymaktivität, da das katalytische Zentrum blockiert wird. Im Gegensatz dazu kann die GSK3-Aktivität durch Phosphorylierung von Tyr₂₁₆ (GSK3 β) respektive von Tyr₂₇₉ (GSK3 α) gesteigert werden. Die Wirkung von GSK3 wird außerdem sehr oft durch den Grad der Phosphorylierung der Substrate beeinflusst. Viele dieser Substrate müssen bereits phosphoryliert sein (pre-phosphoryliert, primed), damit sie von GSK3 phosphoryliert werden können. Eine andere Möglichkeit die Aktivität zu beeinflussen beruht auf Interaktionen mit anderen Proteinen. Durch diese Komplexbildung wird der Kontakt von GSK3 zu einer so genannten „Primer Kinase“ hergestellt, die für das Wirken von GSK3 teilweise unverzichtbar ist.

Stoffwechsel/Signalproteine	Strukturproteine	Transkriptionsfaktoren
AcetylCoA Carboxylase	DF3/MUC1	β -Catenin
Amyloid Precursor Protein	Dynamin-like Protein	C/EBP
APC	Kinesin light chain	CREB
ATP-citrat Lyase	MAP1B	GATA4
Axin	MAP2	HIF-1
Cubitus interruptus	Neural cell-adhesion Protein	HSF-1
Cyclic-AMP-dependent Protein kinase	Neurofilaments	Mash1
Cyclin D1	Ninein	MITF
Cyclin E	Tau	c-Myb
eIF2B	Telokin (KRP)	c-Myc
Glykogen Synthase		NeuroD
hnRNP		NFAT
Insulin Rezeptor Substrat-1		NF- κ B (p65/p105)
Myelin basic protein		Notch
NGF Rezeptor		p53
Nucleoporin p62		TCF
P21		AP-1
Presenilin1		
Protein Kinase A (RII subunit)		
Protein Phosphatase 1		
Protein Phosphatase Inhibitor 2		
Pyruvat Dehydrogenase		

Tabelle 1.3. Vermeintliche Substrate der Glykogen Synthase Kinase 3. Die für die Alzheimerkrankheit relevanten Proteine sind **fettgedruckt**.

1.6.1 Die Rolle von GSK3 β in der Pathologie der Alzheimer-Demenz

GSK3 nimmt Einfluss auf das Entstehen verschiedenster Krankheiten (z.B. Diabetes,^[154] Krebs,^[155] Schizophrenie,^[156] wie durch die Vielzahl der natürlichen Substrate nicht verwunderlich erscheint. Als regulierende Kinase ist GSK3 β auch in die Entstehung der intrazellulären Neurofibrillären Bündel und der extrazellulären A β -Plaques, der beiden Kennzeichen der AD, involviert.

Auch wenn die Hyperphosphorylierung beim Entstehen der AD kontrovers diskutiert wird, so kann mit Sicherheit gesagt werden, dass hyperphosphoryliertes Tau eine verringerte Affinität zu den Mikrotubuli besitzt, sich von diesen ablöst, und somit nach der Tau-Hypothese entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt.

Tau besitzt in seiner längsten Form 17 Ser/Thr-Pro-Sequenzen, von welchen die meisten in der pathogenen Form, der Neurofibrillären Bündel, phosphoryliert auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens 12 dieser Stellen von GSK3 phosphoryliert werden können,^[157-160] allerdings wird die Phosphorylierung von Tau durch andere Kinasen, wahrscheinlich CDK5, initiiert. Nur wenn ein Ser/Thr-Rest im Abstand von vier Aminosäuren zu einem bereits phosphorylierten Ser/Thr-Rest lokalisiert, kann GSK seine Wirkung ausüben. Bislang konnte in Tiermodellen von Tauopathien noch nicht eindeutig belegt werden, ob eine Inhibition von GSK3 die Neurodegeneration verhindert oder hemmt.^[154] In Versuchen von transgenen Mäusen, die Tau überexprimieren, zeigt sich allerdings, dass Tau hyperphosphoryliert wird und die Tiere durch eine verminderte räumliche Orientierung auffallen.^[161-163]

Neben der Tau-Phosphorylierung tritt das Enzym auch mit anderen Molekülen in Interaktion, die in der Alzheimerkaskade von Bedeutung sind. So ist z.B. bekannt, dass GSK3 β an die Aminosäurereste 250-298 von Presenilin1 (PS1) binden kann.^[164] Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe des bei PS1 vermuteten aktiven Zentrums, so dass ein direkter Einfluss auf die APP-Prozessierung angenommen wird. Von funktionaler Bedeutung scheint auch die von GSK3 β abhängige Phosphorylierung des Ser₃₉₇, welche das Niveau der C-terminalen Fragmente reguliert. In Arbeiten von Kirschenbaum et al. konnten allerdings keine eindeutigen Effekte der PS1-Phosphorylierung auf die APP-Spaltung festgestellt werden.^[165,166] Trotzdem sieht es so aus, dass die GSK3-Aktivität die A β -Bildung über das PS1 beeinflussen könnte, weshalb es weiter von großem Interesse ist, diese Möglichkeit genau zu untersuchen.

Neben der Rolle von GSK3 β bei der Regulation von PS1 besteht außerdem ein direkter Zusammenhang zwischen GSK3 β und APP. Die Kinase ist *in vitro* in der Lage, das in der cytoplasmatischen Domäne befindliche Thr₇₄₃ zu phosphorylieren.^[167] Gleichzeitig haben A β -Fragmente einen aktivierenden Einfluss auf GSK3 β , so dass auch in umgekehrter Richtung eine Verknüpfung zwischen GSK3 und APP-Prozessierung zu finden ist.^[168]

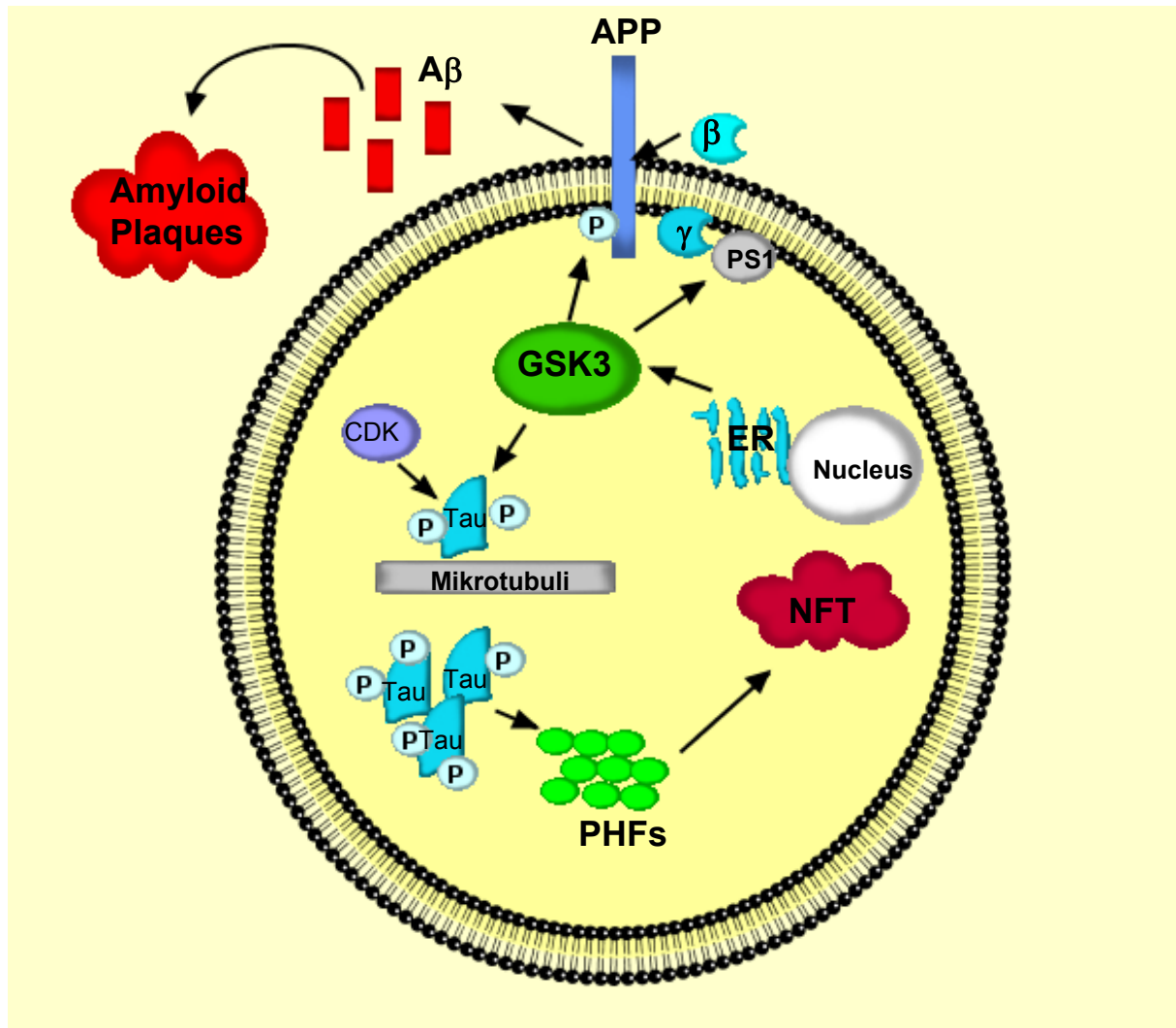


Abbildung 1.17. Verknüpfungen von GSK3 und der Alzheimer-Demenz.

1.6.2 Oxidativer Stress, Calcium-Homöostase und Zelltod

Die Mechanismen zur Bildung der Neurofibrillären Bündel und der A β -Plaques werden immer besser verstanden. Die Konsequenzen dieser Ablagerungen für den Krankheitsverlauf können allerdings noch nicht mit absoluter Klarheit aufgezeigt werden.

Erhöhter oxidativer Stress, also die unkontrollierte Produktion von hoch reaktiven Sauerstoffradikalen, und ein fehlerhafter Energiestoffwechsel der Zelle sind Merkmale einer ganzen Reihe von altersbedingten Krankheiten. Gerade in der Umgebung von Plaques und Neurofibrillären Bündeln zeigen Gehirnzellen von Alzheimerpatienten unnormal hohe Mengen an oxidativ veränderten Proteinen, Lipiden und DNA, weshalb ein direkter Zusammenhang offensichtlich erscheint.^[169] Infolgedessen wurden verschiedenste Möglichkeiten, wie A β oder die redoxaktiven Metalle Fe²⁺ und Cu⁺, als Quellen für den oxidativen Stress untersucht.^[25,169,170]

Während des Aggregationsprozesses bildet A β durch unterstützende Einwirkung von Fe²⁺ und Cu⁺ Wasserstoffperoxid,^[24,171] ein hochreaktives Zellgift, welches zur Lipidperoxidation beiträgt. Es kommt zur Bildung von 4-Hydroxynonenal (4HNE), einem neurotoxischen Aldehyd, welches die Modifizierung bzw. Zerstörung einiger Membranproteine einleitet und Proteinaggregationen auslöst.^[172] A β kann außerdem die Elektronentransportkette der Mitochondrien schwächen. Es kommt zu einer Verminderung der ATP-Produktion und zur Bildung von Superoxidionen, welche durch die Wirkung der Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid überführt werden. Durch Interaktion mit Fe²⁺- und Cu⁺-Ionen entstehen Hydroxylradikale, die zur Dysfunktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beitragen. Superoxid interagiert zusätzlich mit Stickstoffmonoxid und erzeugt Peroxynitrit, welches den „Mitochondrien-Stress“ erhöht (Abb. 1.18).

Ein gestörter Energiestoffwechsel konnte in „Gehirn-Imaging-Studien“ von lebenden Alzheimerpatienten nachgewiesen werden.^[173] In transgenen Mäusen wurde außerdem ein erniedrigter Glucosestoffwechsel in Verbindung mit einer erhöhten Menge von A β festgestellt.^[24,174] Weiterhin hat sich gezeigt, dass die hypoxische (auf Sauerstoffmangel beruhende) Toleranz in APP mutierten Mausmodellen erniedrigt ist, weshalb eine frühe Rolle des gestörten Energiemetabolismus als pathogene Folge der abnormalen APP-Prozessierung angenommen wird.^[175]

Der durch A β ausgelöste oxidative Stress hat außer den beschriebenen Auswirkungen des Energiestoffwechsels drastische Folgen für das

Calciumgleichgewicht der Zelle. Das Calciumion (Ca^{2+}) übernimmt entscheidende Funktionen in Gedächtnis- und Lernvorgängen. Außerdem ist es bei Prozessen involviert, die über Leben oder Zelltod von Nervenzellen entscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass Nervenzellen mit neurofibrillären Ablagerungen sowohl hohe Konzentrationen von Ca^{2+} besitzen als auch eine erhöhte Aktivität von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen und Kinasen aufzeigen.^[176] $\text{A}\beta$ scheint die Calcium-Homöostase zu beeinflussen, indem der induzierte oxidative Stress die Funktion der Ionenkanäle stört und somit einen erhöhten Calciumeinstrom begünstigt. Andere Indizien sprechen dafür, dass $\text{A}\beta$ die Calciumkonzentration durch Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, die mit dem Calciumgleichgewicht verbunden sind, erhöht.^[177,178] In verschiedenen Studien von Lymphocyten sowohl von Patienten mit familiärer als auch sporadischer Alzheimererkrankung und von APP als auch PS1 mutierten Mäusen, konnten Fehler im Calciumhaushalt nachgewiesen werden, so dass ein Beitrag der Ca^{2+} -Homöostase im Krankheitsverlauf stark anzunehmen ist.^[179]

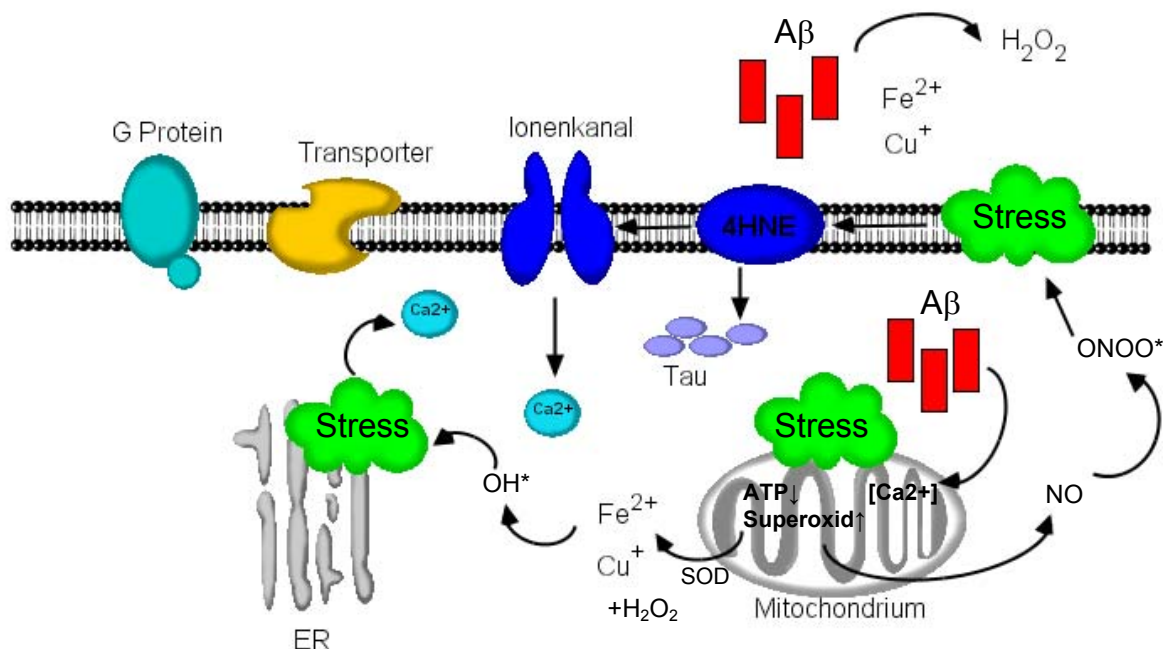


Abbildung 1.18. $\text{A}\beta$ verursacht oxidativen Stress und Störung der Calcium-Homöostase. SOD = Superoxid Dismutase; ER = Endoplasmatisches Retikulum.

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, welche Änderungen des Cytoplasmas, des ER, der Mitochondrien und des Zellkerns beinhaltet. Die Alzheimersche Krankheit ist durch den Tod von Nervenzellen charakterisiert. Als mögliche Auslöser für den Zelltod werden neben erhöhtem oxidativen Stress, DNA Schädigung und fehlerhafter Calcium-Homöostase vor allem die A β -Bildung diskutiert. A β -Ablagerungen sind stets von Apoptose auslösenden Proteinen begleitet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass A β den programmierten Zelltod in kultivierten Neuronen auslöst.^[180,181]

2 Wirkstoffdesign

Am Anfang fast aller Prozesse in biologischen Systemen steht die wechselseitige molekulare Erkennung. Bis auf wenige Ausnahmen interagieren fast alle heute bekannten Arzneistoffe mit einem makromolekularen Ziel über spezifische Bindungsstellen. Die Affinität eines solchen Wirkstoffes zu einer makromolekularen Zielstruktur wird häufig als Maß für die Charakterisierung der biologischen Aktivität dieser Substanz verwendet.

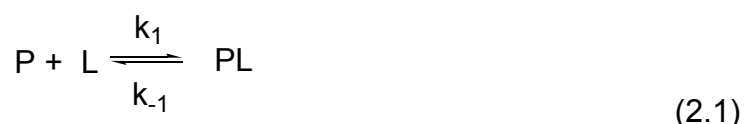
Erstmals wurden solche Ansätze vor mehr als 100 Jahren durch Emil Fischers Schlüssel-Schloss-Prinzip erkannt.^[181] Während dieses Modell das puzzleartige Zusammenfügen von zwei starren molekularen Geometrien beschreibt, geht man heute vielmehr von einer induzierten Anpassung von Ligand und Protein aus. Bei dieser *induced fit* genannten dynamischen Erkennung werden in Abhängigkeit von der Zeit viele molekulare Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Konformationen des Liganden und Proteins ausgebildet bis sich schließlich ein stabiler, nicht notwendig der stabilste Protein-Ligand-Komplex bildet. Dieses von Daniel E. Koshland 1958 postulierte Modell^[182] verdeutlicht, dass neben der molekularen 3D-Struktur auch noch weitere Dimensionen wie Zeitachsen (z.B. Reaktionsabläufe oder Dynamiken) oder mit dreidimensionalen Raumpunkten oder Flächen verknüpfte molekulare Eigenschaften (Oberflächenpotentiale, Wasserstoffbrückenbindungen) eine weitere und bedeutende Rolle spielen.

Das Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist zusammenfassend von fundamentaler Bedeutung für die Medizinische Chemie und speziell für das Wirkstoffdesign. Die Erforschung der Zusammenhänge zwischen molekularer Struktur und biochemischer Wirkung bestimmt die Methodik der modernen Arzneimittelforschung. Molekularbiologische Verfahren zielen darauf ab, gestörte Aktivitäten von Rezeptoren als Ursache von Krankheiten zu identifizieren, sowie diese Proteine zu isolieren und zu analysieren. Wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben wurde, konnten so für die Alzheimersche Krankheit verschiedenste Proteine und Enzyme identifiziert werden, die für das Entstehen der Krankheit verantwortlich gemacht werden. Aufgabe des Wirkstoffdesigns ist es nun, durch geometrische und chemisch komplementäre Anlagerung kleiner Moleküle die gestörte Aktivität eines Proteins zu verändern. Um den Prozess molekularer

Erkennung besser zu verstehen, sollen in den folgenden Abschnitten wichtige Aspekte der intermolekularen Interaktionen beschrieben werden.

2.1 Die Stärke von Protein-Liganden-Interaktionen (IC_{50} , K_i)

Die selektive Bindung niedermolekularer Liganden (L) an ein spezifisches Protein (P) wird durch die strukturelle und energetische Erkennung zwischen beiden bestimmt.^[183] Aussage über die Stärke einer solchen Ligand-Protein-Interaktion (PL) liefert die experimentell bestimmbare Gleichgewichtskonstante K_{eq} der Gleichgewichtsreaktion.



Durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes gilt für die Gleichgewichtskonstante:

$$K_{eq} = \frac{[PL]}{[P] + [L]} \quad (2.2)$$

Zur Beschreibung der Stabilität eines Protein-Liganden-Komplexes wird in der Praxis oft der Kehrwert der Gleichgewichtskonstante, die so genannte Dissoziationskonstante K_D verwendet. Handelt es sich bei dem Protein um ein Enzym und bei dem Ligand um ein Substrat, spricht man auch von der Michaelis-Konstante (K_M). Im speziellen Fall von Wirkstoff und Rezeptor wird diese Konstante auch Inhibitionskonstante K_i bezeichnet.

Zwischen der Gleichgewichtskonstante besteht eine direkte Beziehung zur Freien Standardenthalpie der Bindung (im Folgenden auch Bindungsaffinität genannt) ΔG^0 über die Beziehung:

$$\Delta G^0 = RT \ln(K_i) = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (2.3)$$

Experimentell bestimmte Inhibitionskonstanten liegen typischerweise in einem Bereich zwischen 10^{-2} und 10^{-12} mol/L, was einer Freien Standardbindungsenthalpie

von -10 bis -70 kJ/mol bei $T = 298 \text{ K}$ entspricht.^[184] Eine Änderung der Freien Standardenthalpie um 5.7 kJ/mol bewirkt bei dieser Temperatur eine Änderung der Inhibitionskonstanten um eine Größenordnung.

In der Praxis wird die Bindungseigenschaft eines Inhibitors in der Regel über den IC_{50} -Wert bestimmt. Dieser entspricht der Konzentration, bei der die Substanz die Hälfte des zuvor gebundenen Liganden verdrängt hat. Der IC_{50} -Wert ist von der Konzentration des eingesetzten Liganden abhängig. Über die Cheng-Prusoff-Gleichung können allerdings IC_{50} -Werte in K_i -Werte überführt werden.^[185] Die Herleitung dieser Beziehung soll im Folgenden kurz skizziert werden.

Für die kompetitive Bindung eines Liganden L und eines Inhibitors I an ein Enzym E gilt:

$$K_D = \frac{[E][L]}{[EL]}; K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}; [E_0] = [E] + [EI] + [EL]; L \approx L_0; I \approx I_0 \quad (2.4)$$

Der Index 0 steht für die jeweils eingesetzte Anfangskonzentration. Es wird angenommen, dass sowohl Ligand als auch Inhibitor relativ zum Enzym im Überschuss vorliegen. Vor der Zugabe eines Inhibitors liegt der Belegungsgrad des Enzyms mit Ligand ξ bei

$$\xi = \frac{[EL]}{[E_0]} = \frac{[L_0]}{[L_0] + K_D} \quad (2.5)$$

und nach der Zugabe des Inhibitors liegt die im Gleichgewicht vorhandene Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei

$$[EI] = \frac{[E_0] - [EL]}{1 + \frac{K_i}{[I_0]}} \quad (2.6)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung (2.6) ergibt sich für K_D aus Gleichung (2.4):

$$K_D = \frac{\left([E_0] - [EL] - \frac{[E_0] - [EL]}{1 + \frac{K_i}{[I_0]}} \right)}{[EL]} \quad (2.7)$$

Daraus ergibt sich für den Belegungsgrad des Enzyms in Anwesenheit eines Inhibitors:

$$\xi = \frac{[EL]}{[E_0]} = \frac{[L_0]}{[L_0] + K_D \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i} \right)} \quad (2.8)$$

Ein Enzymbelegungsgrad von 50% des Inhibitors entspricht dem IC_{50} -Wert, daraus ergibt sich:

$$\frac{1}{2} \frac{[L_0]}{[L_0] + K_D} = \frac{[L_0]}{[L_0] + K_D \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i} \right)} \quad (2.9)$$

Für den IC_{50} -Wert gilt dann:

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[L_0]}{K_D} \right) \quad (2.10)$$

Die Größe K_i ist wie bereits erwähnt unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Liganden, weshalb es dadurch einfacher wird, Datensätze aus verschiedenen Experimenten zu vergleichen.

2.2 Faktoren, die die Bindungsaffinität von Protein-Liganden-Komplexen bestimmen

Eine nicht-kovalente Bindung eines Liganden an einen Rezeptor wird von elektrostatischen Wechselwirkungen (Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wechselwirkungen zu Metallionen), von Solvations- und Desolvationsbeiträgen sowie von der Komplementarität der jeweiligen Raumstruktur beeinflusst.^[186,187] Außerdem sind Einflüsse, die durch intramolekulare Veränderungen bei Rezeptor und Ligand im Verlauf der Komplexbildung auftreten können, zu berücksichtigen.^[183]

2.2.1 Elektrostatische Wechselwirkungen

Elektrostatische Wechselwirkungen beruhen auf Ladungsdifferenzen von Molekülen. Durch die Elektronegativität jedes Atoms können sich so genannte partielle Ladungen ausbilden. Diese Ladungsdifferenzen innerhalb eines Moleküls beeinflussen auch die umliegenden Moleküle. Unter den elektrostatischen Wechselwirkungen übernehmen die Wasserstoffbrückenbindungen wohl die wichtigste Rolle in der wechselseitigen molekularen Erkennung. Nach der gegenwärtig akzeptierten Definition einer Wasserstoffbrückenbindung von Pimentel und McClellans beruhen sie hauptsächlich auf der elektrostatischen Anziehung zwischen einem an ein elektronegatives Atom X (meist N oder O) gebundenes Wasserstoffatom und einem weiteren elektronegativen Atom Y oder einem π -Elektronensystem.^[188] Charakteristisch sind Abstände zwischen 2.5 und 3.2 Å zwischen Wasserstoffbrückendonator X und –akzeptor Y sowie ein X-H...Y Winkel von 130-180°. ^[189,190] Kürzere Abstände bis zu 2.2 Å gehen einher mit einem eher kovalenten Bindungscharakter und größerer Bindungsenergie.^[189]

Die Berücksichtigung der Eigenschaften von Wasserstoffbrückenbindungen im Wirkstoffdesign ist außerordentlich wichtig. Bei der Bildung einer Wasserstoffbrücke in einem Protein-Liganden-Komplex darf beispielsweise nicht vernachlässigt werden, dass bereits bestehende, in ihrer Stärke vergleichbare evtl. sogar stärkere Wasserstoffbrücken der funktionellen Gruppen des freien Proteins bzw. des Liganden mit dem umgebenden Wasser dazu aufgebrochen werden müssen. Die Differenz der Freien Enthalpien aus diesen Beiträgen des H-Brücken-

Austauschprozesses bestimmt letztlich, ob die Wasserstoffbrücken-Bildung zwischen Protein und Ligand zur Bindungsaffinität beiträgt.

Je nach Elektronegativität der beteiligten Atome können Wasserstoffbrücken in schwache und starke Wechselwirkungen eingeteilt werden (Tab. 2.1). Die meisten zählen dabei zu den *High-barrier* H-Brücken (HBHB). Das H-Atom ist hier stärker an das Donoratom gebunden als an das Akzeptoratom. Hingegen liegt bei den *Low-barrier* H-Brücken (LBHB) das Wasserstoff-Atom gleichermaßen zwischen den beiden Atomen verteilt vor. Diese Brücken sind symmetrisch aufgebaut, haben einen Winkel von 180° und sind sehr stark.

LB-H-Brücken	HB-H-Brücken		
O-H...O ⁻ F-H...F	<i>Starke</i> O-H...O O-H...N N-H...O	<i>Schwache</i> N-H...N	<i>Sehr schwache</i> O-H... π -System

Tabelle 2.1. Stärke von Wasserstoffbrücken.

Neben den Wasserstoffbrücken können geladene Gruppen des Liganden an entgegengesetzt geladene Gruppen des Proteins über ionische Wechselwirkungen (auch Salzbrücken genannt) für die molekulare Erkennung verantwortlich sein. Im Protein sind bei physiologischem pH-Wert (ca. 7.4) die Guanidin-Seitenketten von Arginin ($pK_a = 12.5$) und die Aminseitenkette von Lysin ($pK_a = 10.8$) protoniert und damit positiv geladen. Die Imidazol-Seitenkette von Histidin ($pK_a = 6.5$) kann in Abhängigkeit der mikroskopischen Umgebung protoniert oder neutral vorliegen. Negativ geladene Gruppen stellen die Carboxylat-Seitenketten von Asparagin- ($pK_a = 3.9$) und Glutaminsäure ($pK_a = 4.1$) dar. Allerdings hängt der genaue Protonierungszustand auch hier von den lokalen elektrostatischen Verhältnissen in der Umgebung der jeweiligen funktionellen Gruppe ab und kann sich sogar während der Ligandenbindung ändern.^[191]

Wesentliche Beiträge zur Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor liefern auch sog. Dispersionswechselwirkungen (van-der-Waals-Wechselwirkungen, London-Dispersionskräfte). Es handelt sich dabei um Anziehungskräfte zwischen induzierten Dipolen, welche auf sehr kurzem Abstand wirken ($\sim 1/r^6$) und sehr schwach sind, sich bei größeren Assoziationsflächen aber zu beträchtlichen Energiebeiträgen

summieren. Bei zu nahem Kontakt kommt es zu einer stark abstoßenden Wechselwirkung, die von $1/r^{12}$ abhängt.

Außerdem wird der Ligandenbindungsprozess durch hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst. Diese beschreiben das Bestreben zur Aggregation lipophiler Gruppen in wässriger Lösung.^[192] Hierzu werden auch Stapel (*face to face*) und T-förmige (*edge to face*) Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen gezählt.^[193] Der klassische hydrophobe Effekt ist durch eine hohe günstige Komplexierungsentropie, welche auf der Verdrängung und Freisetzung geordneter Wassermoleküle beruht und einen geringen enthalpischen Beitrag gekennzeichnet.

2.2.2 Beiträge durch Solvation und Desolvatation

Die molekulare Erkennung zwischen zwei Molekülen findet in biologischen Systemen in wässriger Umgebung statt. Wasser kommt daher – zusätzlich zu der im vorigen Kapitel beschriebenen Rolle bei der Energetik von Wasserstoffbrückenbindungen – eine besondere Funktion bei der Bildung von Protein-Ligand-Komplexen zu.^[194,195]

Wassermoleküle beeinflussen auf verschiedene Art und Weise die Funktion, Dynamik oder Struktur von Protein und Ligand. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, welche räumlichen Voraussetzungen für die Wassermoleküle vorhanden sind.

Man unterscheidet i. A. drei verschiedene Typen von Wassermolekülen, die die Bildung von Protein-Ligand-Komplexen in biochemischen Reaktionen beeinträchtigen.

„Freies“ Wasser, welches über Wasserstoffbrücken tetraedrisch miteinander koordiniert ist und so ein schnell fluktuierendes dreidimensionales Netzwerk ausbildet, indem Wassermoleküle in ihrer Beweglichkeit nicht eingeschränkt sind, steht in keinem direkten Kontakt zum Biomolekül.

Wasser an den molekularen Grenzflächen hydratisiert dagegen die biologischen Makromoleküle mit polaren Gruppen an der Oberfläche über Dipol-Dipol-Kräfte. Hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche zwingen dabei die Wassermoleküle, eine mit abgewandten Wasserstoffbrücken angeordnete Struktur anzunehmen und führen so zur Senkung der Entropie. Dadurch ist das System bestrebt, die hydrophoben Flächen zu minimieren. Dieser auch als hydrophober Effekt bezeichnete Prozess nimmt bei Proteinen großen Einfluss auf die Faltung und Konformation. Außer der ersten, an das Molekül gebundenen Wasserhülle bilden

sich noch weitere Hydratschichten um das Biomolekül. Dieses gebundene Wasser unterscheidet sich in seinen thermodynamischen Eigenschaften von dem „freien“ Wasser der Umgebung.^[196,197]

„Verborgenes“ Wasser sitzt in Bindungstaschen von Enzymen und Rezeptoren oder in Hohlräumen mit hydrophoben Bereichen von Proteinen. Diese Wassermoleküle haben nicht nur andere physikalische Eigenschaften als „freies“ Wasser (z.B. eine andere Dielektrizitätskonstante), sondern erfüllen auch die wichtige Aufgabe der Stabilisierung der Proteinkonformationen.

Vor einer Komplexbildung zwischen einem Protein und einem Liganden gilt es folgende Eigenschaften für die molekulare Erkennung zu berücksichtigen:

- Die „leere“ Bindungstasche des Proteins ist mit Wassermolekülen gefüllt. Diese sind entweder frei assoziiert oder bilden Wasserstoffbrücken zum Protein aus.
- In der Nähe der lipophilen Bereiche sind die Wassermoleküle hochgeordnet und dadurch in einem thermodynamisch ungünstigen Zustand.
- Geladene Proteinseitenketten sind von Wassermolekülen nach dem Prinzip der Ionen-Dipol-Wechselwirkung hydratisiert.
- Der Ligand ist ebenfalls von Wassermolekülen umgeben und korrespondiert mit diesen über Wasserstoffbrücken- oder Ionen-Dipol-Wechselwirkung.

Während der Komplexbildung drängt die Protein-Ligand-Bindung zunächst die Wassermoleküle aus der Bindungstasche heraus. Ebenso muss der Ligand teilweise seine Wasserhülle abstreifen. Diese in das freie Lösungsmittel herausdiffundierenden Wassermoleküle können nun untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden. Dabei können genauso viele H-Brücken neu gebildet werden, wie zuvor gebrochen wurden. Der Gewinn der freien Bindungsenthalpie ergibt sich aus der unterschiedlichen Stärke und Anzahl der Wasserstoffbrücken und dem Beitrag der Entropie. Dieser Entropiebeitrag steigt durch die erhöhte Bewegungsfreiheit der Wassermoleküle. Falls der Ligand mehr Wasserstoffbrücken zum Rezeptor ausbilden kann als im freien Zustand, kommt es zu einer besonders festen Komplexbildung.

Außerdem kommt es während der Komplexbildung zum Zusammenschmelzen der lipophilen Bereiche bei Rezeptor und Protein. Dies führt zu einer Zunahme der Entropie, bedingt durch die erhöhte Beweglichkeit der Wassermoleküle im freien

Lösungsmittel. Je mehr Wassermoleküle aus der hydrophoben Umgebung freigesetzt wurden, umso größer ist ihr Bindungsbeitrag. Auch hier kann die Zahl der Wasserstoffbrücken steigen.

2.3 Auffinden und Optimierung einer Leitstruktur

Die Suche nach neuen Wirkstoffen in der modernen Arzneimittelforschung orientiert sich an so genannten Leitstrukturen. Leitstrukturen sind Moleküle, welche eine gewisse biologische Aktivität aufweisen, deren Eigenschaften jedoch einer weitergehenden Optimierung bedürfen, um als Medikament potenziell geeignet zu sein.^[198]

Einer anfänglichen, schnellen und verlässlichen Identifizierung von Leitstrukturen kommt eine besondere Bedeutung in der Arzneimittelentwicklung zu. Gegenwärtig existieren für die Suche nach neuen Leitstrukturen zwei generelle, einander ergänzende Methoden: Das Screening von großen Substanzbibliotheken, und das rationale, auf der Basis von vorhandenen Strukturinformationen beruhende Design.

Die Mehrheit fast aller modernen Arzneimittel wurde über so genannte *Random-Screening*-Verfahren identifiziert. Es handelt sich dabei um eine Methode, welche sich an der traditionellen Arzneimittelsuche orientiert, eine große Anzahl von Substanzen unabhängig von ihrer Struktur auf eine eventuelle Wirkung in einem Bioassay zu untersuchen.^[199,200] Durch Miniaturisierung und Automatisierung der Testverfahren ist man heute in der Lage, im *High Throughput Screening* (HTS) sehr viele Verbindungen in kurzer Zeit zu bewerten.^[201] Durch Verfahren der kombinatorischen Chemie oder der automatisierten Parallelsynthese, mit deren Hilfe in kurzer Zeit Bibliotheken mit mehreren zehntausend Substanzen ausgehend von einigen wenigen Reaktanden hergestellt werden können, wird versucht, die enorme Kapazität solcher HTS-Methoden auszuschöpfen. Die Trefferraten betragen allerdings weniger als eine Promille der Anzahl der eingesetzten Substanzen,^[202] weshalb man nach Verbesserungen dieser Vorgehensweise gesucht hat. In jüngster Zeit werden daher besonders *Nonrandom*- oder *Targeted-Screening*-Ansätze angewendet, bei denen die Testsubstanzen hinsichtlich maximaler paarweiser Diversität z.B. in Bezug auf ihre chemischen Eigenschaften^[203], zu erwartender günstiger pharmakokinetischer Eigenschaften^[204] oder anderen Kriterien computergestützt selektiert werden.

Durch enorme Fortschritte in der Strukturaufklärung von Proteinen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse oder der Kernresonanzspektroskopie sowie der Weiterentwicklung leistungsfähiger Computermodelle ist auch immer mehr ein rationales Design von Leitstrukturen möglich geworden.^[205] Dabei werden generell zwei Ansätze unterschieden: ein liganden- oder ein strukturbasiertes *Drug Design*.

Dem strukturbasierten Design von Inhibitoren geht eine bekannte dreidimensionale Rezeptorstruktur voraus. Wichtig dabei ist, dass potentielle Bindungstaschen erkannt und ihre Zusammensetzung identifiziert werden. Anhand solcher Strukturen werden mögliche Liganden vorgeschlagen, welche nach Synthese auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Dazu gibt es zwei grundlegende Ansätze: Das Einpassen kompletter Ligandenstrukturen in die Bindungstasche (*Docking*) und der schrittweise Aufbau neuer Liganden unter Zuhilfenahme einer Simulation der Bindungstasche. Im Rahmen eines solchen *de novo* Designs werden in der Bindungstasche neue Leitstrukturen durch Verknüpfung vorher platzierter Atome oder Fragmente oder den sukzessiven Aufbau eines Moleküls ausgehend von einer „Keimstelle“ erzeugt.^[206] Die Informationen erfolgreicher Inhibitor-Kandidaten können für weitere Optimierungen verwendet werden.

Ein ligandenbasiertes Design wird in der Regel angewendet, wenn keinerlei dreidimensionale Information des Rezeptors existiert. Stattdessen stehen meist die Strukturen unterschiedlich aktiver Verbindungen zur Verfügung. Nach einer Konformationsanalyse wird ein so genanntes pharmakophores Modell generiert, welches diejenigen Teile eines Moleküls darstellt, welche für dessen pharmakologische Wirkung verantwortlich sind. Mit Hilfe dieses Pharmakophors können Moleküldatenbanken auf potentielle neue Leitstrukturen durchsucht werden und die Affinität dieser Verbindungen vorhergesagt werden.

2.4 Pharmakokinetik

Neben der Optimierung der Affinität von Leitstrukturen zu einem *target* ist es in der präklinischen Arzneimittelentwicklung außerdem von großem Interesse bestimmte Eigenschaften der potentiellen Kandidaten vorhersagen bzw. abschätzen zu können. Um für einen Arzneistoff eine passende Darreichungsform und sinnvolle Dosierungsempfehlungen zu entwickeln sind die pharmakokinetischen ADME-Eigenschaften (*absorption, distribution, metabolism, excretion*) entscheidend. Die

Pharmakokinetik beschreibt, wie rasch und in welchem Ausmaß nach der Verabreichung eines Stoffes dieser anschließend im Blutplasma und in den verschiedenen Körpergeweben auftritt und wo und in welcher Weise er wieder ausgeschieden wird.

Die Verabreichung eines Medikaments kann oral, durch Aufnahme und Absorption des Wirkstoffes im Magen-Darm-Trakt oder durch verschiedenste Arten von Injektionen und Diffusionen durch Haut oder Schleimhäute erfolgen.^[207] Man unterscheidet dabei die systemische und die lokale Anwendung. Für systemische Anwendungen ist die orale Aufnahme die bevorzugt angestrebte Art der Verabreichung. Um den Wirkungsort zu erreichen, muss der Wirkstoff dabei mit lipophilen (z.B. Membranen) und wässrigen (z.B. Cytoplasma) Umgebungen wechselwirken können. Eine besondere Herausforderung besteht darin, Substanzen zu entwickeln, welche oral verfügbar sind, aber trotzdem die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ihren Wirkstoff im Gehirn entfalten. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf. Sie dient dazu, die Milieubedingungen im Gehirn aufrecht zu erhalten und sie von denen des Blutes abzugrenzen.

Lipophilie, Größe und Ionisationsgrad einer Substanz sind hilfreiche Parameter, um bestimmte Eigenschaften eines potentiellen Wirkstoffkandidaten abzuschätzen. Quantitativ ausgedrückt wird die Lipophilie einer bestimmten Substanz durch den Logarithmus ihres Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$). $\log P$ -Werte können gemessen oder mit relativ hoher Zuverlässigkeit berechnet werden (*calculated* $\log P$, clogP).^[208] Ein weiterer nützvoller Parameter für die Abschätzung des Verhaltens einer Substanz ist die *molecular polar surface area* (PSA). Diese ist definiert als Summe an Oberflächen von polaren Atomen (üblicherweise Sauerstoff, Stickstoff...) in einem Molekül.

Durch eine statistische Analyse von Christopher A. Lipinski im Jahr 1997 von den damals im WDI (*world drug index*) verzeichneten 50.000 Wirkstoffen, konnten qualitative Regeln für die Eigenschaften von geeigneten (*drug-like*) Molekülen aufgestellt werden. Nach dieser *Lipinski's rule of five* sollte ein oralverfügbarer Wirkstoff das Molekulargewicht von 500 g/mol nicht überschreiten, sein $\log P$ sollte unter 5 sein und es sollten nicht mehr als 5 H-Brücken Donor- und nicht mehr als zehn H-Brücken Akzeptor-Atome im Molekül vorhanden sein.^[209,210] Obwohl es sich bei dieser Regel lediglich um eine qualitative Aussage mit vielen Ausnahmen

handelt, verletzen weniger als 10% der bekannten Wirkstoffe gleichzeitig zwei Punkte. Es sollte aber nicht vergessen werden, dass Moleküle, die jedem dieser Aspekte entsprechen, nicht automatisch als *drug-like* zu bewerten sind. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass diese Regel für Arzneistoffe aufgestellt wurde, nicht aber für potentielle Leitstrukturen gilt, die meistens ein geringeres Molekulargewicht besitzen.

3 Problem- und Aufgabenstellung

Die steigende Lebenserwartung des Menschen wird zu einer dramatischen Zunahme der Morbus Alzheimer-Prävalenz führen. Da Alzheimerpatienten außerdem besonders pflege- und damit kostenintensiv sind, könnte die Zunahme der Krankenzahlen zu einem starken Anstieg der Gesundheitskosten führen. Die hauptamtliche Geschäftsführerin der Gesellschaft *Alzheimer's Disease International* (ADI) Elizabeth Rimmer erklärte im Rahmen des Welt-Alzheimertages im September 2004, dass die direkten Kosten für Demenzzranke bei Älteren insgesamt höher sind als für Herzerkrankungen, Krebs und Schlaganfälle zusammen. Trotzdem würden die Forschungsausgaben zu diesem Zeitpunkt nur 10% der Forschungsausgaben für Herzerkrankungen und 3% der Forschungsausgaben für Krebs entsprechen. Alles in allem besteht ein großes Interesse an Therapiemöglichkeiten, die diese Entwicklungen aufhalten.

Es wird davon ausgegangen, dass es nicht eine Ursache für Morbus Alzheimer gibt. Wahrscheinlich sind es viele Faktoren, deren Zusammenwirken von Bedeutung für die Krankheitsentstehung ist.

In der vorliegenden Dissertation werden deshalb verschiedene Ansätze bearbeitet, die mit der molekularen Pathogenese von Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden.

Aufgrund der geschilderten Rolle der β -Sekretase und deren Einfluss auf die Plaquebildung liegt die Verwendung von entsprechenden Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe nahe. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, neue nicht-peptidische BACE-Inhibitoren zu synthetisieren, um deren Potential als potentielle Arzneistoffe zu untersuchen.

Neben der β -Sekretase spielt die γ -Sekretase eine wichtige Funktion in der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Das Potential der γ -Sekretase schien allerdings durch die Tatsache eingeschränkt, dass die Hemmung jene Signalübertragung beeinträchtigen könnte, die über den Rezeptor Notch verläuft. Bekannt ist, dass der Notch-Rezeptor an Wechselwirkungen zwischen Zellen beteiligt ist, die wichtig für Embryogenese, Hämatopoese und für die Differenzierung neuronaler Stammzellen sind. Hohe Dosen

an γ -Sekretase-Inhibitoren verursachen infolge der Unterbrechung des Notch-Signals verschiedene schädliche Effekte bei Mäusen, die ernste Bedenken gegen diese potentielle Therapiemöglichkeit aufkommen lassen. Die Identifizierung von Substanzen, die eine γ -Sekretase-Aktivität so modulieren, dass die A β -Produktion blockiert wird, ohne die Teilung von Notch zu beeinflussen, ließ die γ -Sekretase-Inhibition allerdings wieder zu einem lukrativen *target* in der Alzheimerforschung werden.

Ein Problem bei der Entwicklung von neuen γ -Sekretase-Wirkstoffen ist die nicht geklärte dreidimensionale Struktur des Enzyms. Es wird angenommen, dass die γ -Sekretase aus einem hochmolekularen Komplex aus den Proteinen Presenilin 1 und 2, PEN-2, APH-1 und Nicastrin besteht, wobei sich das aktive Zentrum wahrscheinlich im Presenilin befindet. Eine Kristallstrukturanalyse konnte allerdings durch fehlgeschlagene Co-Kristallisation bislang nicht durchgeführt werden, weshalb insbesondere an der Lokalisierung des aktiven Zentrums letzte Zweifel bestehen.

In einem Projekt dieser Arbeit wurde die Synthese von reversiblen γ -Sekretase-Inhibitoren entworfen. Unter Verwendung solcher Verbindungen ist man in der Lage, die Funktion und den Aufbau der γ -Sekretase besser zu verstehen. Von großem Interesse in diesem Zusammenhang ist außerdem die Identifizierung von γ -Sekretase-Modulatoren, welche als potentielle Leitstrukturen in der Wirkstoffentwicklung von großem Nutzen sein könnten.

Neben der Amyloid-Kaskaden-Theorie ist die Tau-Hypothese weit verbreitet, um die Ursachen von Morbus Alzheimer zu erklären. Anhänger dieser These sehen das entscheidende Ereignis in der Bildung der Fibrillenbündel und der damit verbundenen Zerstörung des Cytoskeletts. Die Fibrillen bestehen aus dem mit den Mikrotubuli assoziierten Protein Tau. Es wird angenommen, dass die Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli das Cytoskelett der Zelle stabilisiert. Im Verlauf der Alzheimer-Demenz wird Tau jedoch hyperphosphoryliert, verliert dadurch seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und bildet stattdessen filamentförmige Aggregate im Zellkörper. Das Cytoskelett bricht letztendlich durch die fehlende Stabilisierung des Tau-Proteins zusammen.^[212]

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation besteht darin, mittels ligandenbasiertem *Drug Design* eine nicht-peptidische Leitstruktur für die Inhibition der Tau-Aggregation zu identifizieren. Durch Synthese und Optimierung eines solchen Antagonisten besteht

die Möglichkeit zum Zugang eines neuen Therapieansatzes der Alzheimer-Demenz. Weiterhin wäre es möglich die Tau-Relevanz bei Morbus Alzheimer zu überprüfen.

Ein weiteres wichtiges Enzym im Krankheitsverlauf von Alzheimer-Demenz scheint die Glykogen Synthase Kinase 3 zu sein. GSK3 β ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die ursprünglich für ihre Rolle bei der Regulation des Glykogen-Metabolismus identifiziert wurde. Viele Hinweise deuten darauf hin, dass GSK3 mit der Tau-Hyperphosphorylierung, der A β -induzierten Neurotoxizität, PS1-Mutationen und der A β -Bildung verknüpft ist. Dies lässt vermuten, dass die GSK3-Deregulation eine Hauptrolle bei der Alzheimerschen Krankheit spielen könnte. Geeigneten Inhibitoren kommt damit ein großes Potential zu, beide Hauptmerkmale der Alzheimer-Demenz nachhaltig bekämpfen zu können. Mit der Synthese von geeigneten GSK3 β -Inhibitoren soll dieser Vermutung nachgegangen werden.

4 Tetram- und Tetronsäuren als β -Sekretase-Inhibitoren

4.1 Einleitung

Die Inhibition der β -Sekretase (BACE1), ein aus der Aspartylproteasefamilie stammenden Enzym, gilt als vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit (siehe Kapitel 1.5.2.1). BACE1 übernimmt eine wichtige Rolle bei der Bildung der A β -Plaques. Diese sind nach der Amyloid-Kaskaden-Theorie von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der Krankheitssymptome.^[13,42] In verschiedenen Studien konnte eine direkte Verbindung zwischen erhöhter BACE1-Aktivität und A β -Aggregation nachgewiesen werden.^[73,74,213] Außerdem sind die Aspartylproteasen eine sehr gut untersuchte Enzymklasse, bei der bislang eine Reihe von Wirkstoffen erfolgreich entwickelt werden konnte.^[55] Kurzum, die β -Sekretase scheint ein ideales *target* für eine Wirkstoffentwicklung zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit zu sein.

Bis heute konnten eine Vielzahl von BACE1-Inhibitoren synthetisiert werden.^[80] Die meisten dieser Verbindungen haben peptidischen Charakter und eignen sich deshalb nur bedingt als Kandidaten für klinische Studien, da sie neben einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit nur geringe Chancen besitzen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Neue nicht-peptidische BACE1-Leitstrukturen sind deshalb von großem Interesse.

Vorteilhaft für die Alzheimerwirkstoffentwicklung sind Erkenntnisse, die über die sehr gut untersuchte HIV-1-Aspartylprotease gewonnen werden konnten. Die Strukturaufklärung von Tipranavir (**20**, Abb. 4.1), einem kompetitiven Inhibitor der HIV-1-Aspartylprotease, der sich momentan in Phase III der klinischen Studien befindet, hat z.B. gezeigt, dass die Enolform des Hydroxypyrons ähnlich den Übergangszustand-Isosteren (Abb. 1.11) mit den katalytisch wirksamen Asparaginsäuren interagiert.^[214] Acylierte Tetron- oder Tetramsäuren wiederum sind der Tipranavir-Struktur sehr ähnlich und wurden ebenfalls auf ihre Wirksamkeit als HIV-1-Protease-Inhibitoren untersucht.^[215,216] Die kompakte Struktur der Tetron- und Tetramsäuren scheint allerdings besser für die geometrischen Ansprüche von

BACE1 geeignet zu sein, die eine längere und schmalere aktive „Tasche“ als die HIV-1-Protease besitzt.^[19]

In Anlehnung an die Struktur eines 4-Hydroxypyran-2-on-HIV-1-Protease-Antagonisten (**21**, Abb. 4.1)^[217] wurde mittels festphasenunterstützter Synthese eine Reihe von Tetram- und Tetronsäuren synthetisiert, die auf ihre Aktivität als BACE1-Inhibitoren getestet wurden.

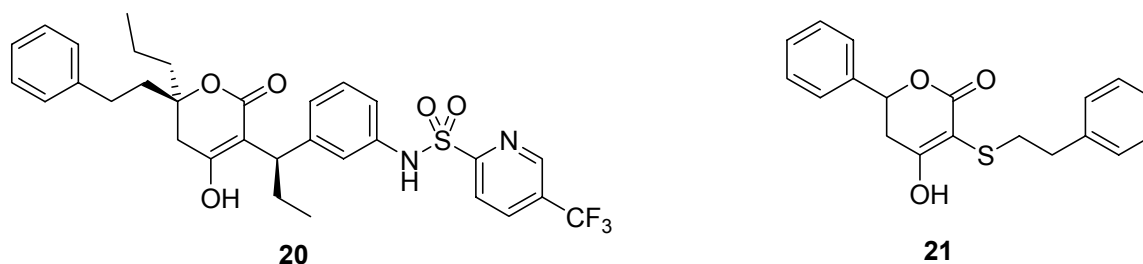


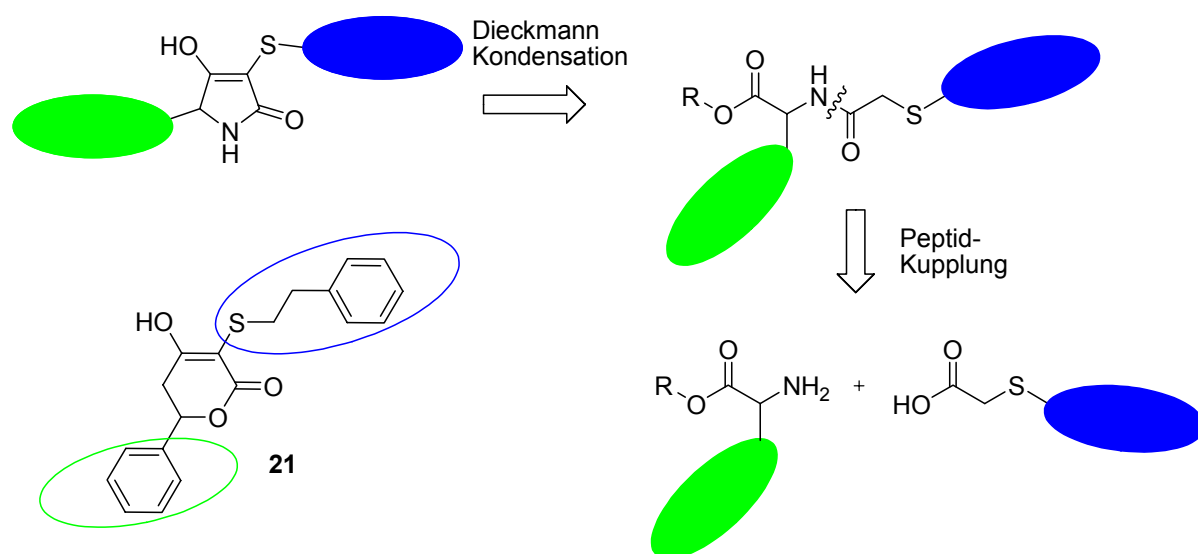
Abbildung 4.1. Strukturen der HIV-1-Inhibitoren Tipranavir (**20**) und eines 4-Hydroxy-2-on-Derivats (**21**).

4.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen

Tetron- und Tetramsäuren sind in der Natur weit verbreitet, wobei Vitamin C (Ascorbinsäure) zweifellos der bekannteste Vertreter unter diesen Naturstoffen ist. Aufgrund ihrer vielseitigen pharmakologischen Wirksamkeit handelt es sich um sehr gut untersuchte Strukturtypen. Neben den schon seit längeren bekannten antibiotischen,^[218] antiepileptischen,^[219] entzündungshemmenden,^[220] schmerzlindernden^[221] oder Antitumor-Eigenschaften^[222] gewisser Verbindungen dieser Substanzklassen, gewannen sie in der Vergangenheit auch als HIV-1-Protease-Inhibitoren^[215] an Bedeutung. Ihre Möglichkeit zur kompetitiven Hemmung von Aspartylproteasen in Verbindung mit ihrem nicht-peptidischen Grundgerüst rückt sie mehr und mehr in den Blickpunkt der Alzheimerforschung, was nicht zuletzt durch ein zeitgleich mit der Entstehung dieser Arbeit veröffentlichtes Patent von Roche bestätigt wird.^[223]

Die Syntheseplanung der gewünschten Tetram- und Tetronsäuren orientiert sich an der Struktur des HIV-1-Inhibitors **21**. Bei gleichbleibendem Rückgrat bestehen Variationsmöglichkeiten der Substituenten auf der „rechten“ (blau) und der „linken“ (grün) Seite des Moleküls (Schema 4.1).

Die retrosynthetische Analyse der Tetramsäuren zeigt, dass durch Verwendung verschiedener Derivate als Ausgangsmaterialien, es relativ einfach erscheint, diese beiden Seiten flexibel zu gestalten. Als Bausteine für eine zweistufige Synthese der Tetramsäuren kommen C-terminal-geschützte Aminosäuren und Thioessigsäure-Verbindungen in Frage. Gerade beim Aminosäurebaustein ist eine große Auswahl an preiswerten, kommerziell erhältlichen Edukten gegeben. Von den Thioessigsäure-Derivaten des vorliegenden Musters sind dagegen nur wenige erhältlich. Über Substitution eines entsprechenden Halogenids mit Thioglykolsäure sollten sie allerdings leicht zugänglich sein.

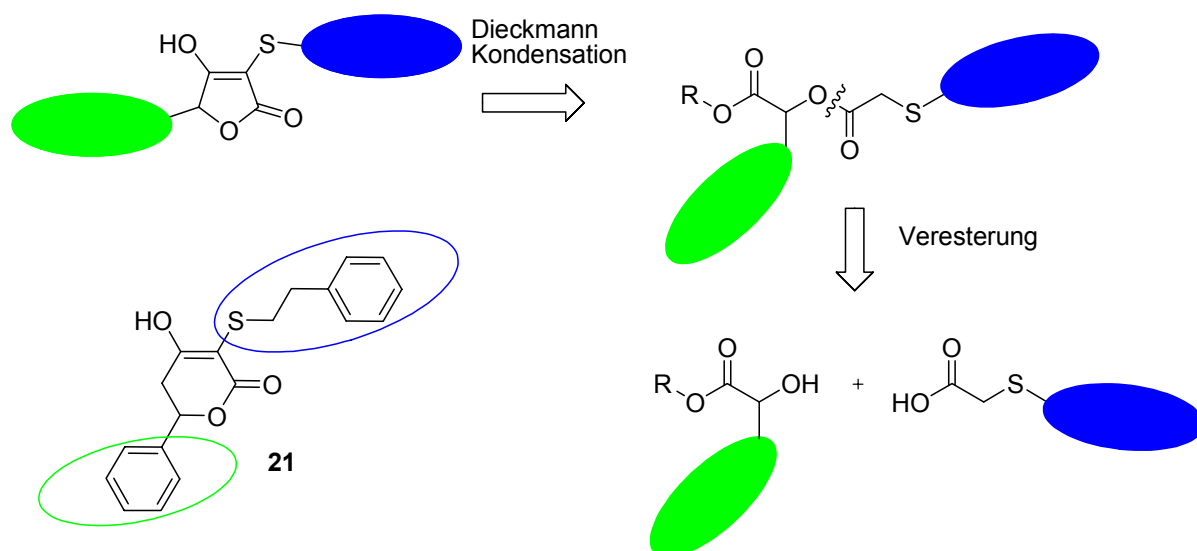


Schema 4.1. Retrosynthetische Betrachtung der Tetramsäuresynthese. Die Syntheseplanung der Tetramsäuren orientiert sich an der Struktur des HIV-1-Inhibitors **21**.

Die Retrosynthese der Tetronsäuren sieht eine sehr ähnliche Reaktionsfolge vor (Schema 4.2). Als Vorläufer zu den cyclischen Produkten kommen Depsipeptide in Frage. Diese können z.B. über Veresterungsreaktionen von α -Hydroxycarbonsäuren mit entsprechenden Thioessigsäure-Verbindungen hergestellt werden. Als negativer Aspekt bei dieser Strategie erscheint allerdings die Tatsache, dass nur relativ wenig α -Hydroxycarbonsäuren kommerziell erhältlich sind. Alternative Darstellungen der entsprechenden Depsipeptid-Vorläufer sollten deshalb in Betracht gezogen werden.

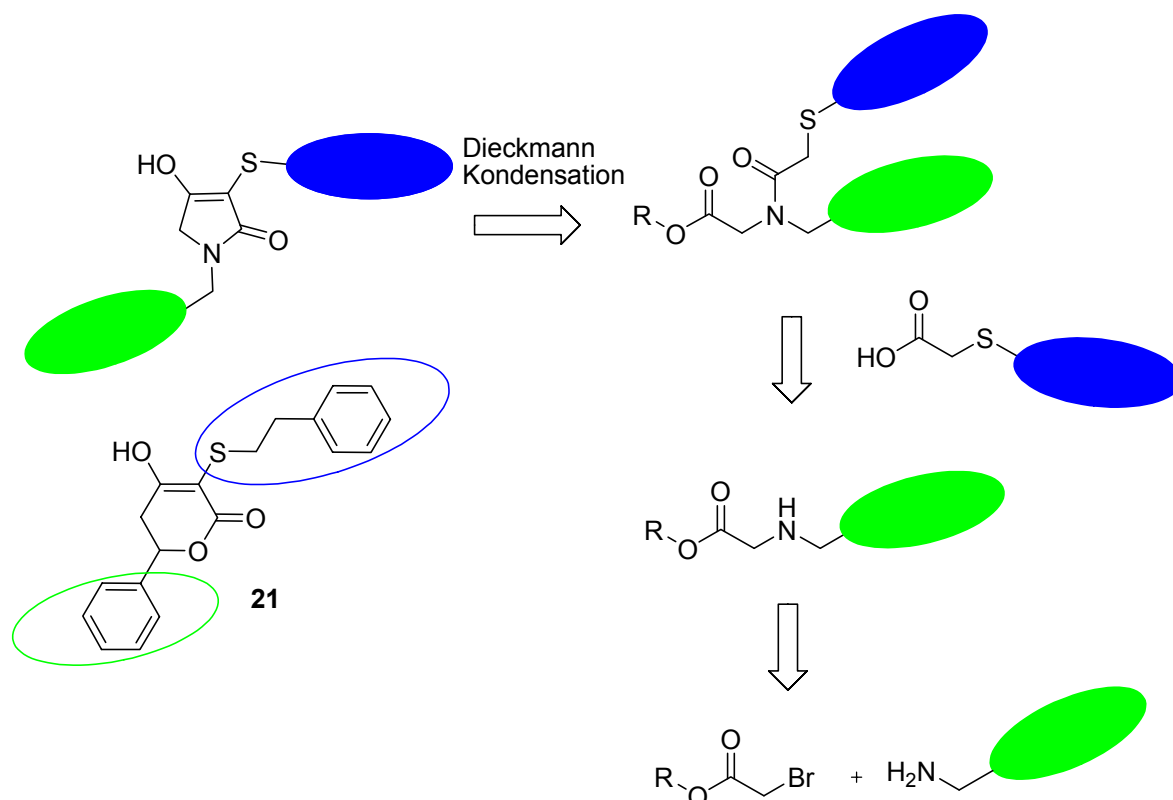
Eine Oxidation des Thioether-Motivs der gewünschten Tetron- und Tetramsäuren zu entsprechenden Sulfoxiden oder Sulfonen erscheint als gute Strategie, um die Affinitäten der potentiellen BACE1-Inhibitoren zu steigern. Durch die Einführung

dieser Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktionalität besteht berechnete Hoffnung, die Interaktion mit Aminosäuren des aktiven Zentrums zu verbessern und so mögliche Aktivitäten zu erhöhen.



Schema 4.2. Retrosynthetische Betrachtung der Tetronsäuresynthese. Die Synthesepfung der Tetronsäuren orientiert sich an der Struktur des HIV-1-Inhibitors **21**.

Durch Synthese einer Serie von speziellen *N*-substituierten Tetramsäuren sollen weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gewonnen werden. Die retrosynthetische Strategie sieht wiederum eine ähnliche Abfolge von Reaktionen vor. Neben den Thioessigsäure-Derivaten können bei diesem Vorhaben primäre Amine als Edukte eingesetzt werden, deren kommerzielle Strukturvielfalt enorm groß ist.



Schema 4.3. Retrosynthetische Betrachtung der Synthese von *N*-substituierten Tetramsäuren. Die Synthese orientiert sich am HIV-Inhibitor **21**.

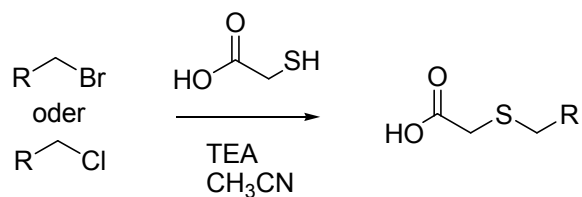
4.2.1 Synthese der Tetramsäuren 43-85

Bislang wurden verschiedene Strategien, sowohl in flüssiger als auch auf fester Phase, zur Synthese von Tetramsäuren vorgeschlagen.^[224-229]

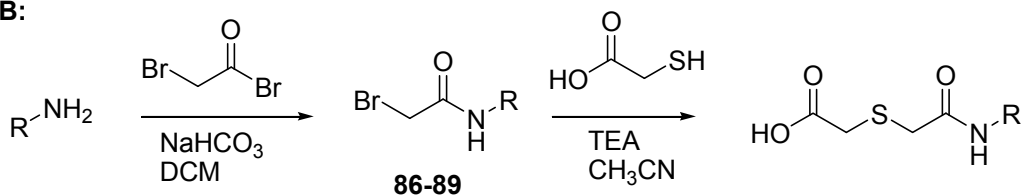
Festphasenunterstützte Ansätze bieten den Vorteil der einfachen Isolierung und Reinigung der Zielverbindungen und eignen sich deshalb besonders gut für automatisierte Parallelsynthesen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Synthese der Tetramsäuren **43-85** (Abb. 4.3, 4.4, 4.5, Schema 4.5) entspricht einer Modifizierung der Methoden von Rivero/Ganesan.^[228,230] Zunächst wurden vier kommerziell erhältliche Fmoc-geschützte Aminosäuren mit lipophilen Seitenketten (**23-26**, Abb. 4.2) ausgesucht und nach einer Methode von Sieber auf ein Wang-Harz gekuppelt.^[231] Im Vergleich zu DCC- und DMAP-Synthesen liefert dieses Verfahren Polymere mit hohem Substitutionsniveau und minimierter Dipeptidformierung. Das so erhaltene Harz **27** wurde unter Verwendung einer 20%igen Lösung von Piperidin in

DMF von der Schutzgruppe befreit. Die Bildung des so entstehenden freienamins konnte mittels Kaiser-Test kontrolliert werden.^[232]

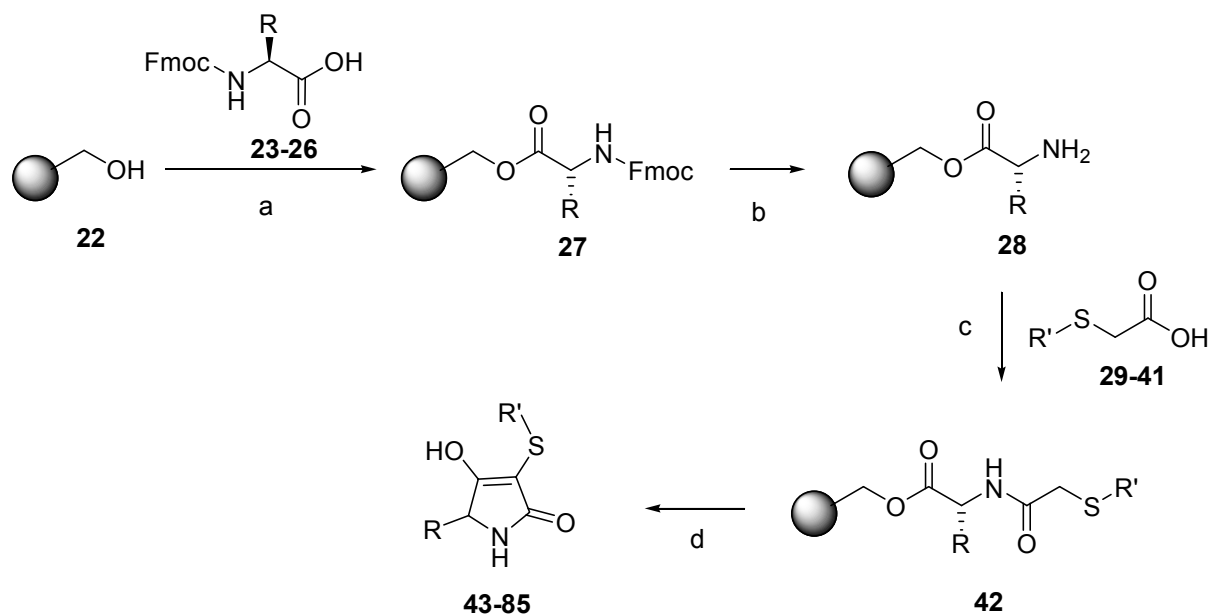
Methode A:



Methode B:



Schema 4.4. Methoden zur Synthese der Thioessigsäure-Derivate **30**, **31**, **35**, **38-41** (Methode A) und der Substanzen **33**, **34**, **36** und **37** (Methode B).



Schema 4.5. Festphasenunterstützte Synthese der Tetramsäuren **43-85**. Reagenzien und Bedingungen: (a) 2,6-Dichlorbenzoylchlorid, Pyridin, RT, 20 h, (b) 20% Piperidin in DMF, RT, 2 h, (c) PyBOP, HOBT, DIEA, DMF, RT, 20 h, (d) KOBu^t, THF, Rückfluss, 1 h.

Anschließend wurden die Thioessigsäure-Verbindungen **29-41** unter Verwendung von PyBOP, HOBt und DIEA in DMF mit dem Harz **28** verknüpft. Die meisten der eingesetzten Thioessigsäure-Verbindungen (Abb. 4.2) sind kommerziell nicht erhältlich und mussten durch Reaktion von Thioglykolsäure mit den entsprechenden Brom- oder Chloralkanen in Acetonitril und Zugabe von Triethylamin selbst hergestellt werden (Schema 4.4). Die Substanzen **33**, **34**, **36** und **37** entstammen einer Zweistufensynthese (Methode B, Schema 4.4). Im ersten Schritt wurde ein entsprechendes primäres Amin in DCM und NaHCO_3 als Base mit 2-Bromacetyl bromid umgesetzt. Das resultierende Brom-Derivat wurde unter den angegebenen Thioglykolsäure-Bedingungen (Methode A) nukleophil substituiert (Schema 4.4). Durch Behandlung von Harz **42** mit KOBu^t in THF unter Rückfluss konnten die racemischen Tetramsäuren **43-85** mit moderaten bis guten Gesamtausbeuten erhalten werden (Schema 4.5).^[228]

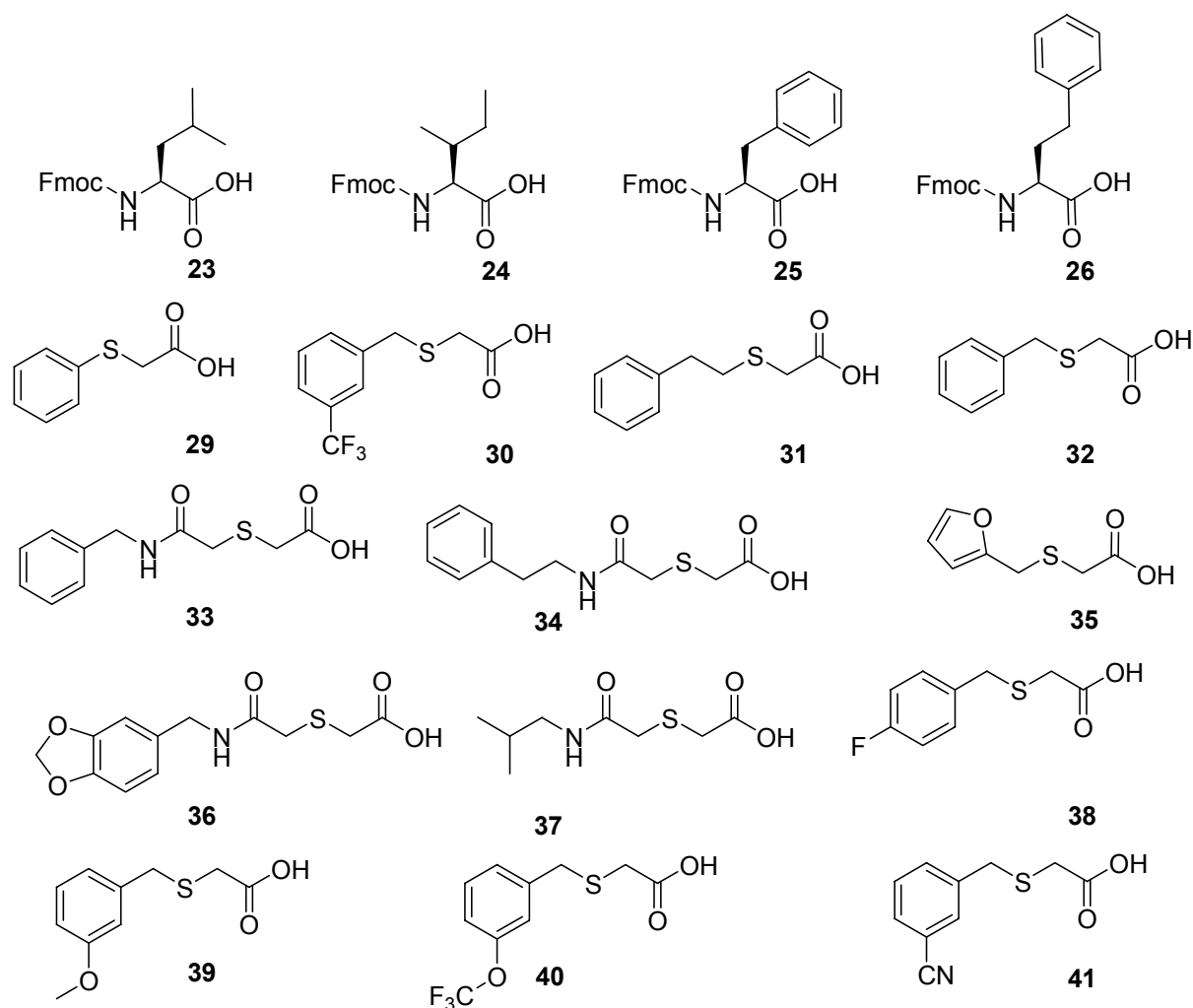


Abbildung 4.2. Eingesetzte Startmaterialien der Tetramsäuresynthesen **43-85**. Verbindung **23-26** sowie **29** und **32** sind kommerziell erhältlich. Die Thioessigsäure-Derivate **30**, **31**, **35**, **38-41** werden nach Methode A (Schema 4.4) synthetisiert. Die Substanzen **33**, **34**, **36** und **37** konnten durch Anwendung der Methode B (Schema 4.4) erhalten werden.

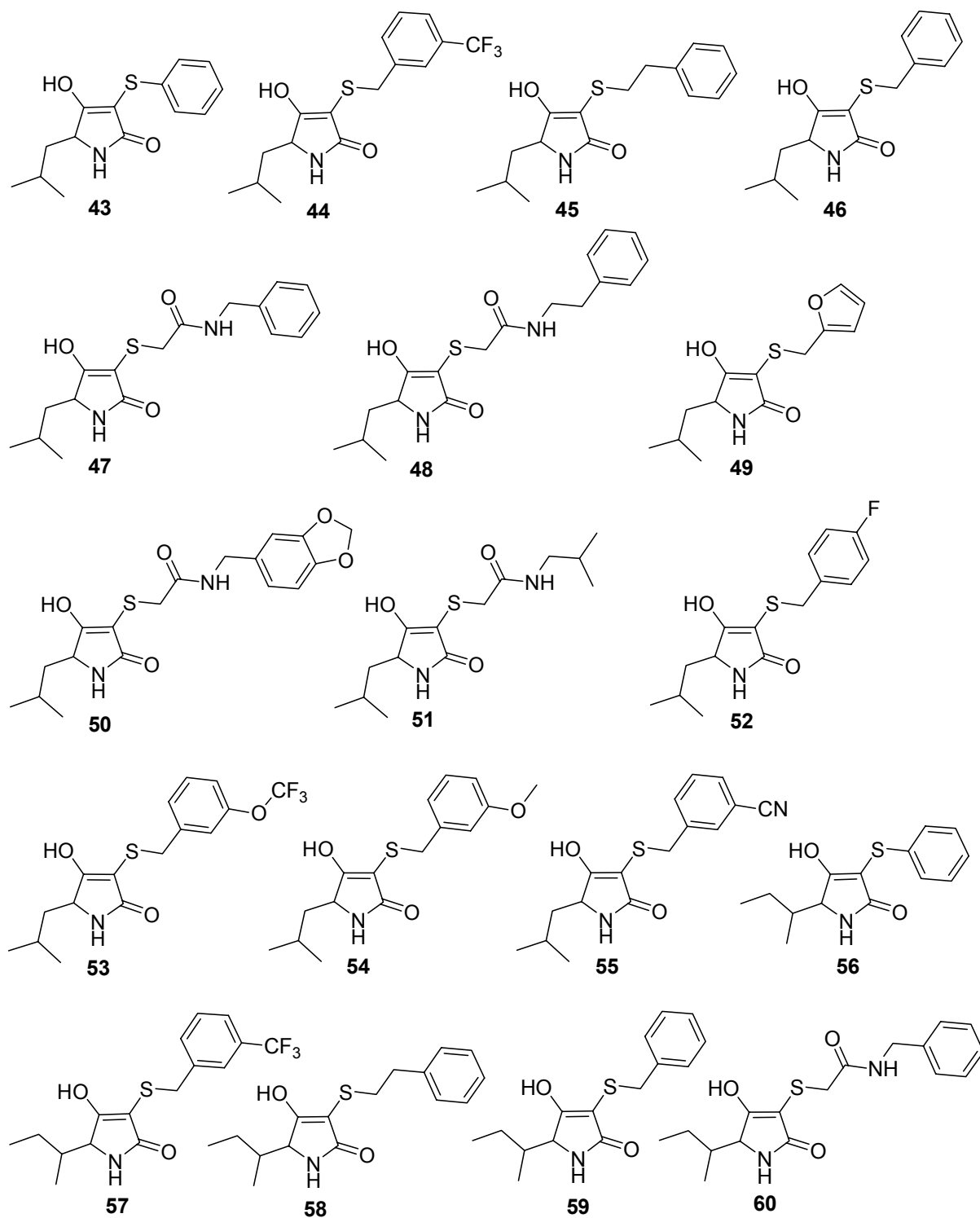


Abbildung 4.3. Strukturen der Tetramsäuren 43-60.

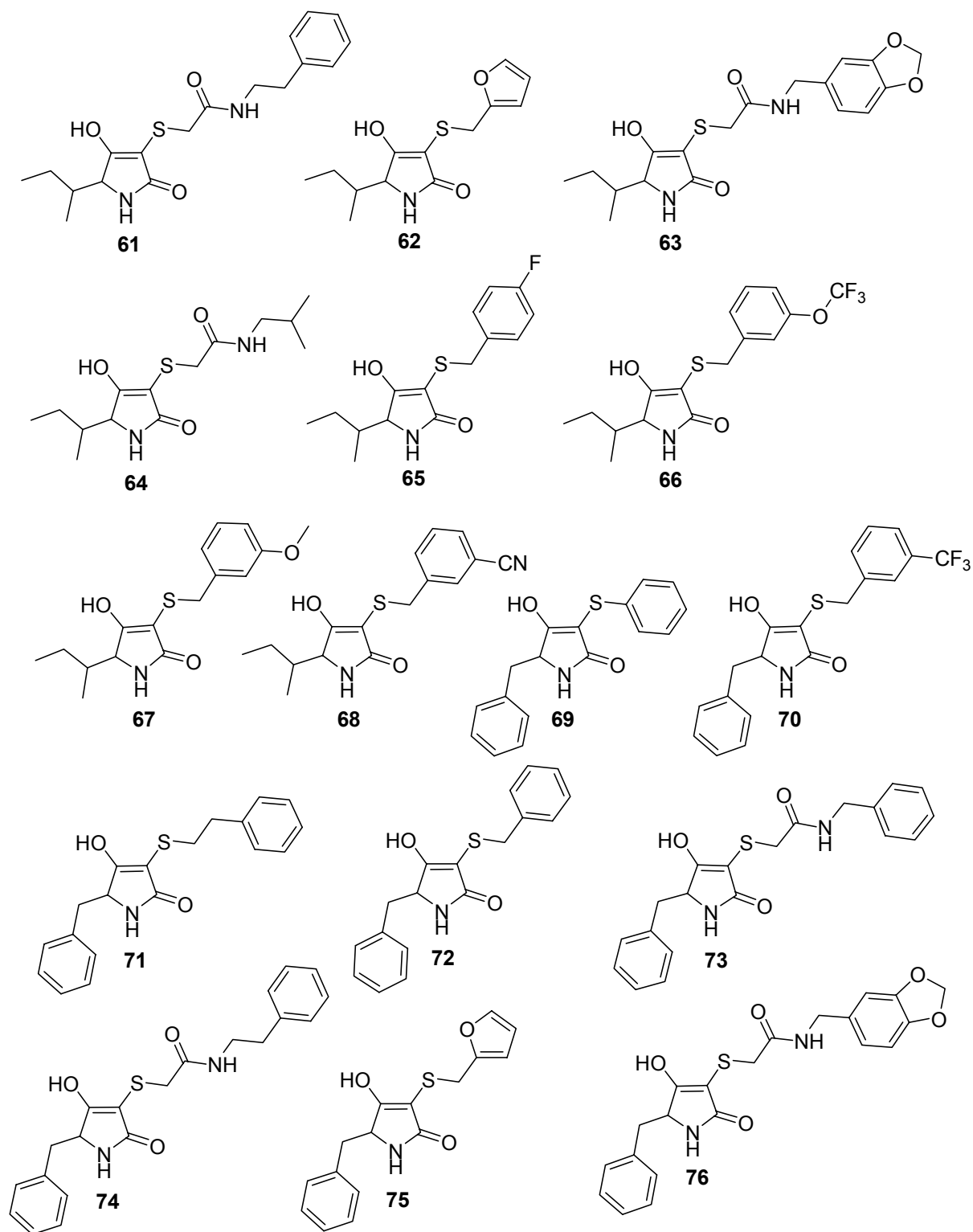


Abbildung 4.4. Strukturen der Tetramsäuren 61-76.

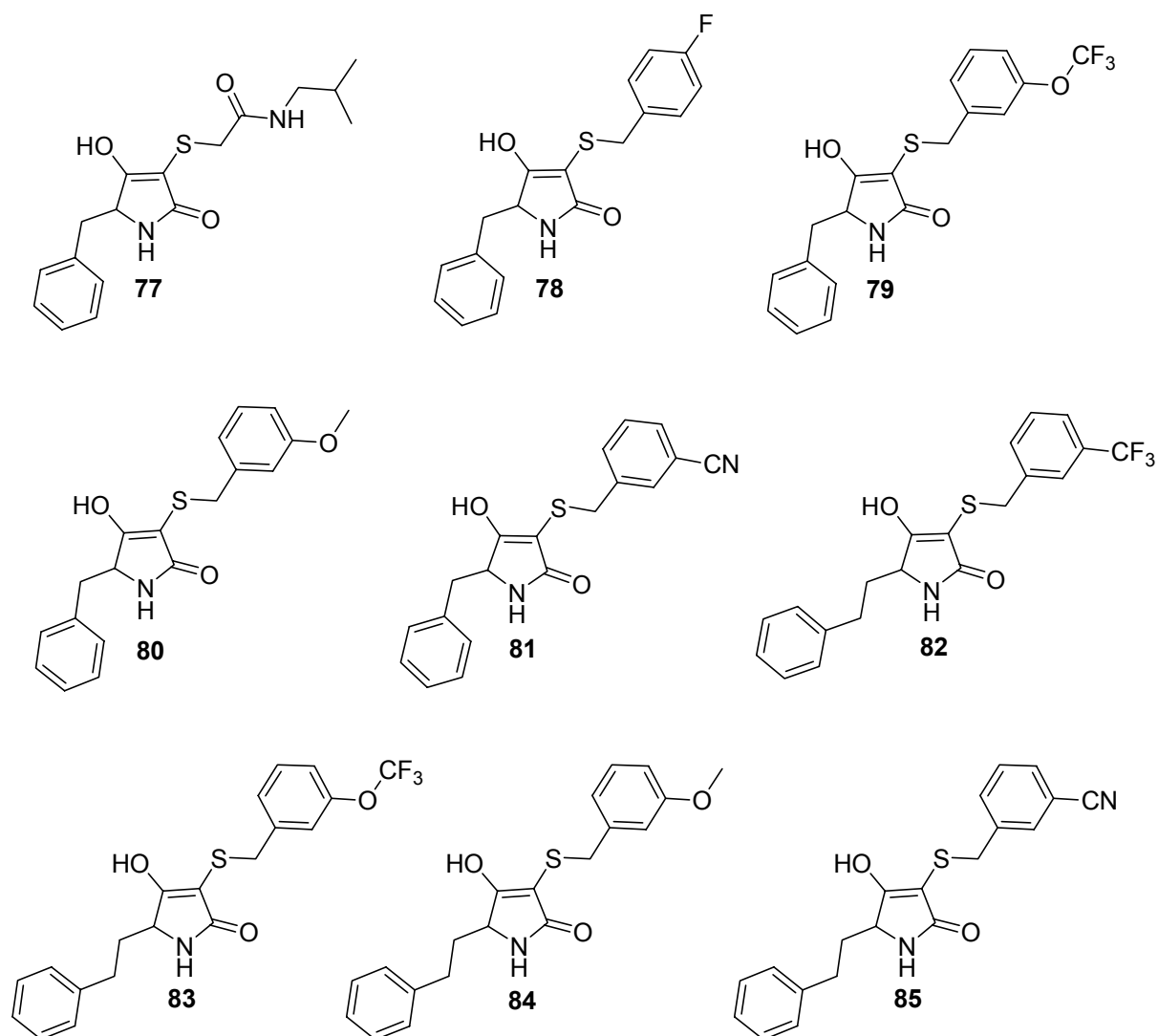


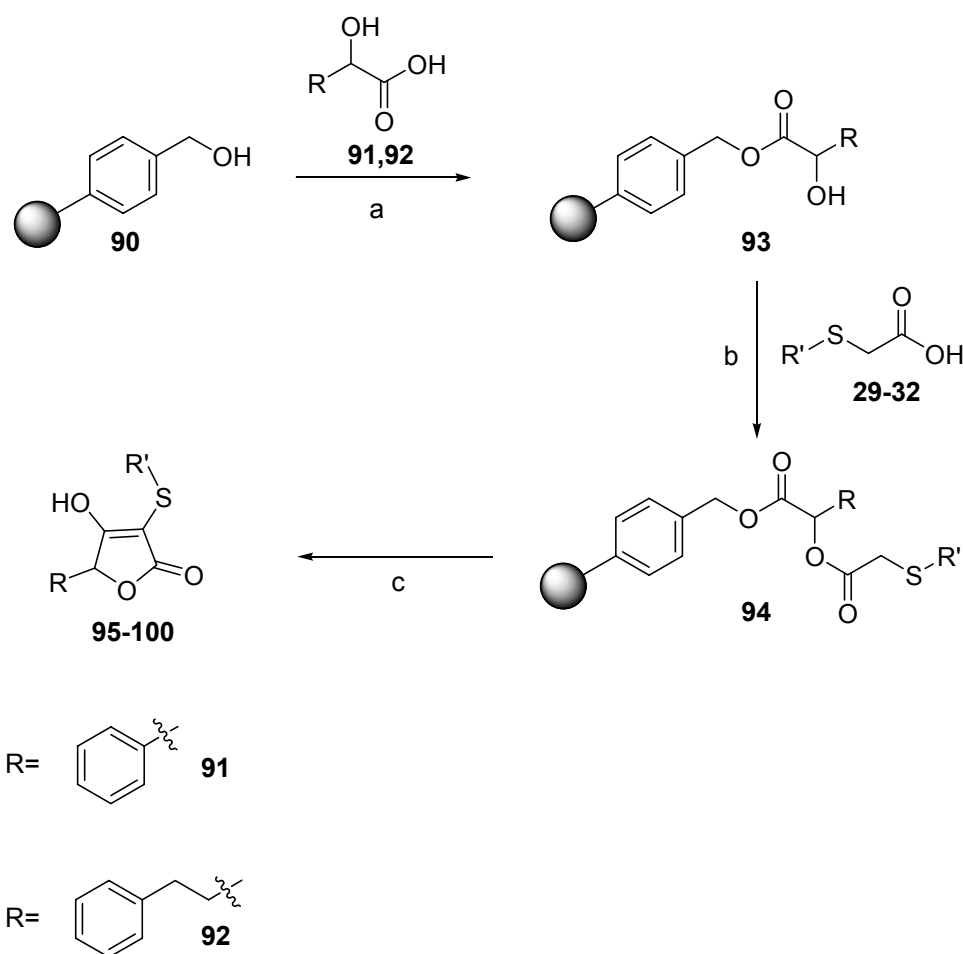
Abbildung 4.5. Strukturen der Tetramsäuren 77-85.

4.2.2 Synthese der Tetronsäuren 95-100

Der erste Schritt der Reaktionssequenz der festphasenunterstützten Synthese der Tetronsäuren (Schema 4.6) lag in der Kupplung der α -Hydroxycarbonsäuren **91** und **92** auf einen polymeren Träger. Verschiedene Reaktionsbedingungen standen zu Beginn der Synthese zur Auswahl. Diese wurden zunächst anhand von Veresterungsreaktionen in flüssiger Phase getestet. Als Nachahmung eines Hydroxymethyl-Harzes wurde Benzylalkohol eingesetzt, welches unter säurekatalysierten Bedingungen mit Mandelsäure zur Reaktion gebracht wurde. Alternativ wurde eine basenvermittelte Reaktion von Benzylchlorid als Nachahmung eines Standard-Merrifield-Harzes mit Mandelsäure getestet. Beide Reaktionen

konnten mittels HPLC verfolgt werden, wobei die säurekatalysierte Umsetzung mit Benzylalkohol Reaktionsprodukte mit höherer Reinheit zu liefern schien.

Des Weiteren wurden Vergleichsexperimente mit einem Wang-Harz und einem Hydroxymethyl-Polystyren von Novabiochem durchgeführt. Unter Verwendung beider Polymere konnten die gewünschten Tetronsäuren erfolgreich synthetisiert werden, allerdings waren beim Syntheseweg mit dem Polystyren die Ausbeuten und die Reinheit der isolierten Produkte höher.



Schema 4.6. Festphasenunterstützte Synthese der Tetronsäuren **95-100**. Reagenzien und Bedingungen: (a) *p*-Toluolsulfonsäure, Toluol, Rückfluss, 20 h, (b) PyBOP, HOBt, DIEA, DMF, RT, 20 h, (c) KOBu^t, THF, Rückfluss, 1 h.

Als Resultat dieser Voruntersuchungen begann die Reaktionssequenz mit der Kondensation der Säuren **91** und **92** auf ein Hydroxymethyl-Harz unter Verwendung katalytischer Mengen *p*-Toluolsulfonsäure und Toluol als Lösungsmittel. Das so erhaltene Harz **93** wurde mit den Thioessigsäuren **29-32** unter PyBOP/HOBt/DIEA-

Bedingungen verknüpft. Cyklisierung und gleichzeitige Spaltung lieferten die Tetronsäuren **95-100** als Racemate (Abb. 4.6).

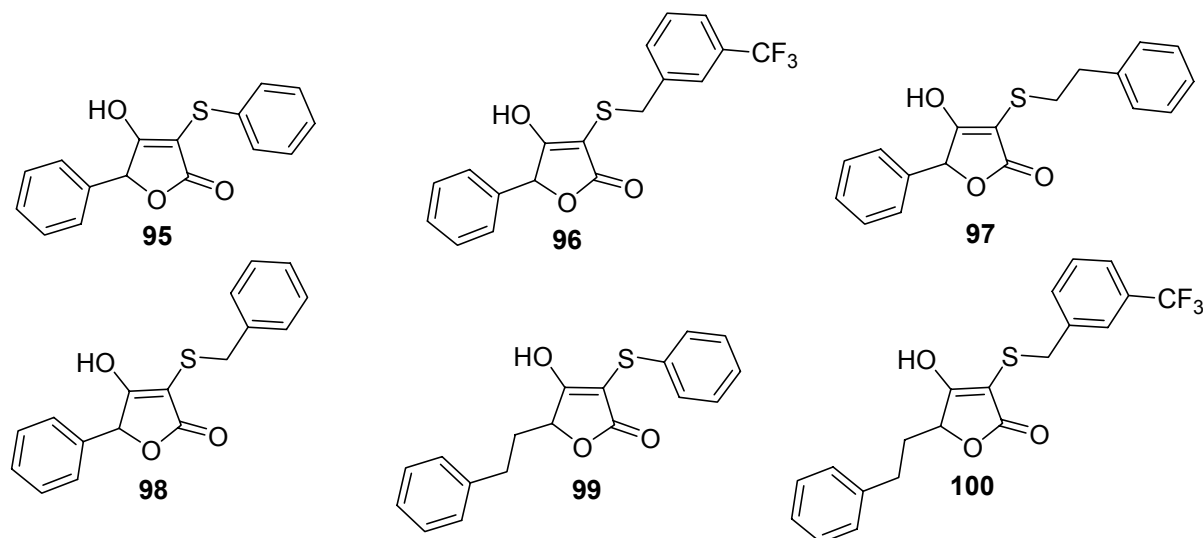
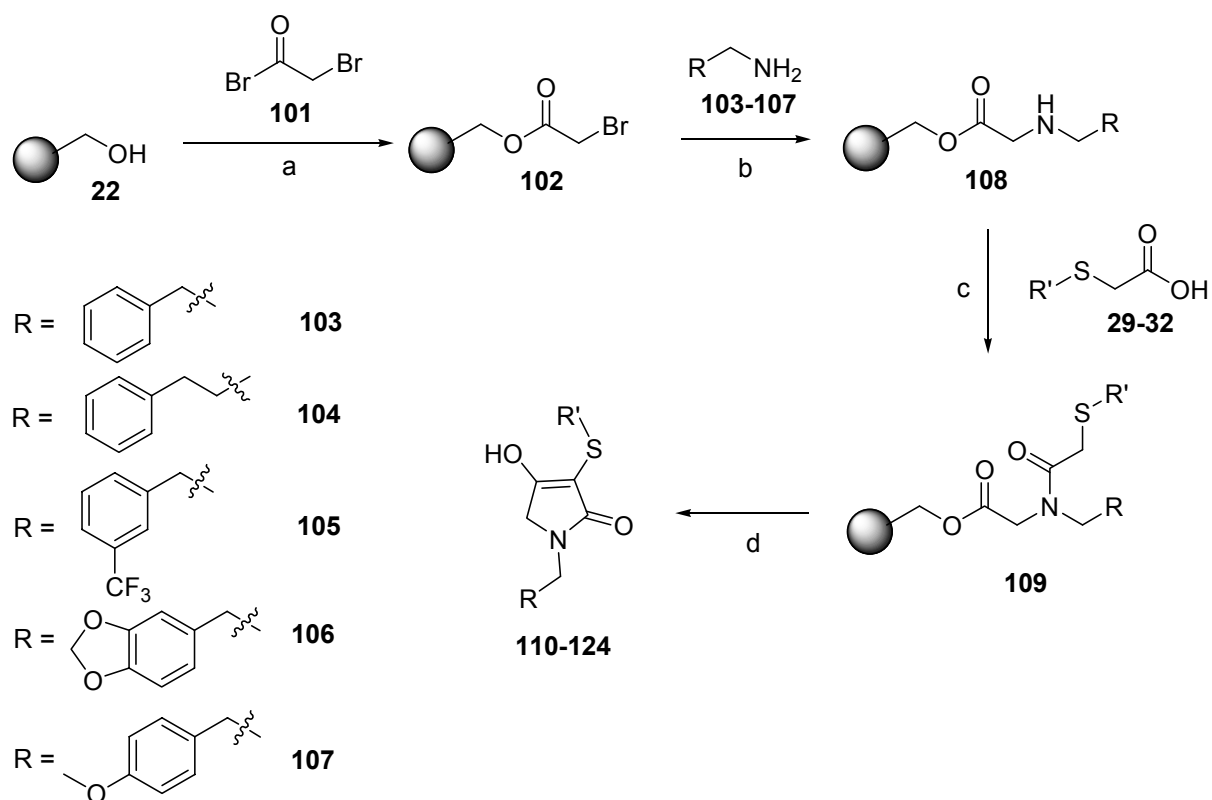


Abbildung 4.6. Strukturen der Tetronsäuren **95-100**.

4.2.3 Synthese der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124**

Die Synthese der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124** gelang über eine vierstufige festphasenunterstützte Methode (Schema 4.7). Herkömmliches Wang-Harz wurde zunächst mit Bromacetylbromid **101** und Triethylamin in DCM umgesetzt. Anschließend wurde das Bromid des entstandenen Polymers **102** durch die primären Amine **103-107** substituiert und das resultierende sekundäre Amin auf dem Harz **108** unter PyBroP/DIEA-Bedingungen mit den Thioessigäure-Derivaten **29-32** verknüpft. Amidkupplungen von sekundären Aminen sind unter Standard-Bedingungen erfahrungsgemäß oft mit Schwierigkeiten verbunden. Die Verwendung von PyBroP als Kupplungsreagenz hat sich gerade für diese Reaktionen mit sekundären Aminen bewährt.^[233-235] Die *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124** wurden nach abschließender Dieckmann-artiger Reaktion von Harz **109** unter Verwendung von KO^tBu in THF in Ausbeuten von 10-34% bezogen auf die vier Stufen mit teils sehr guten Reinheiten erhalten.



Schema 4.7. Festphasenunterstützte Synthese der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124**. Reagenzien und Bedingungen: (a) TEA, RT, 2 h, (b) TEA, RT, 20 h, (c) PyBroP, DIEA, DCM, RT 20 h, (d) KOBu^t , THF, Rückfluss, 1 h.

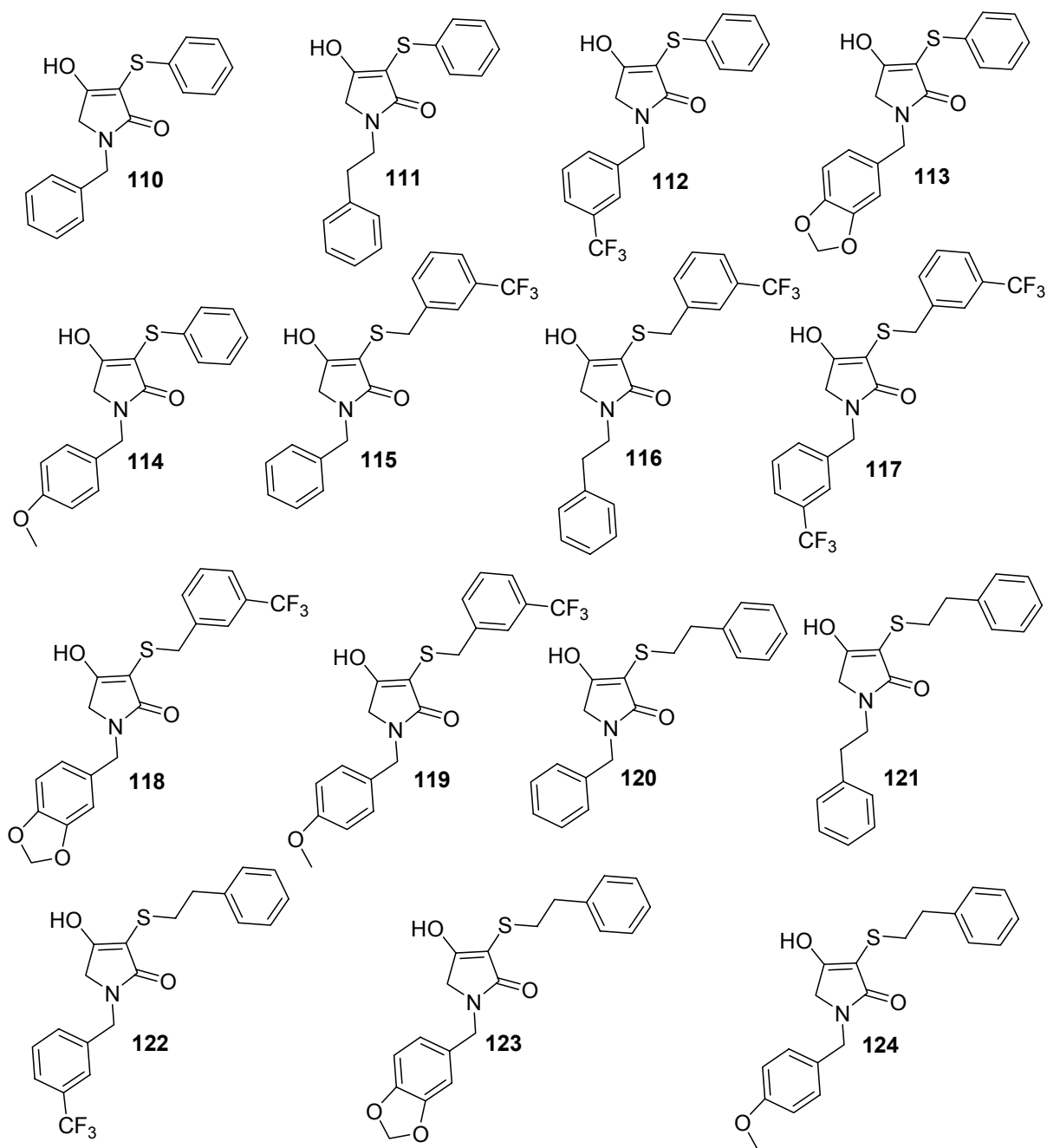
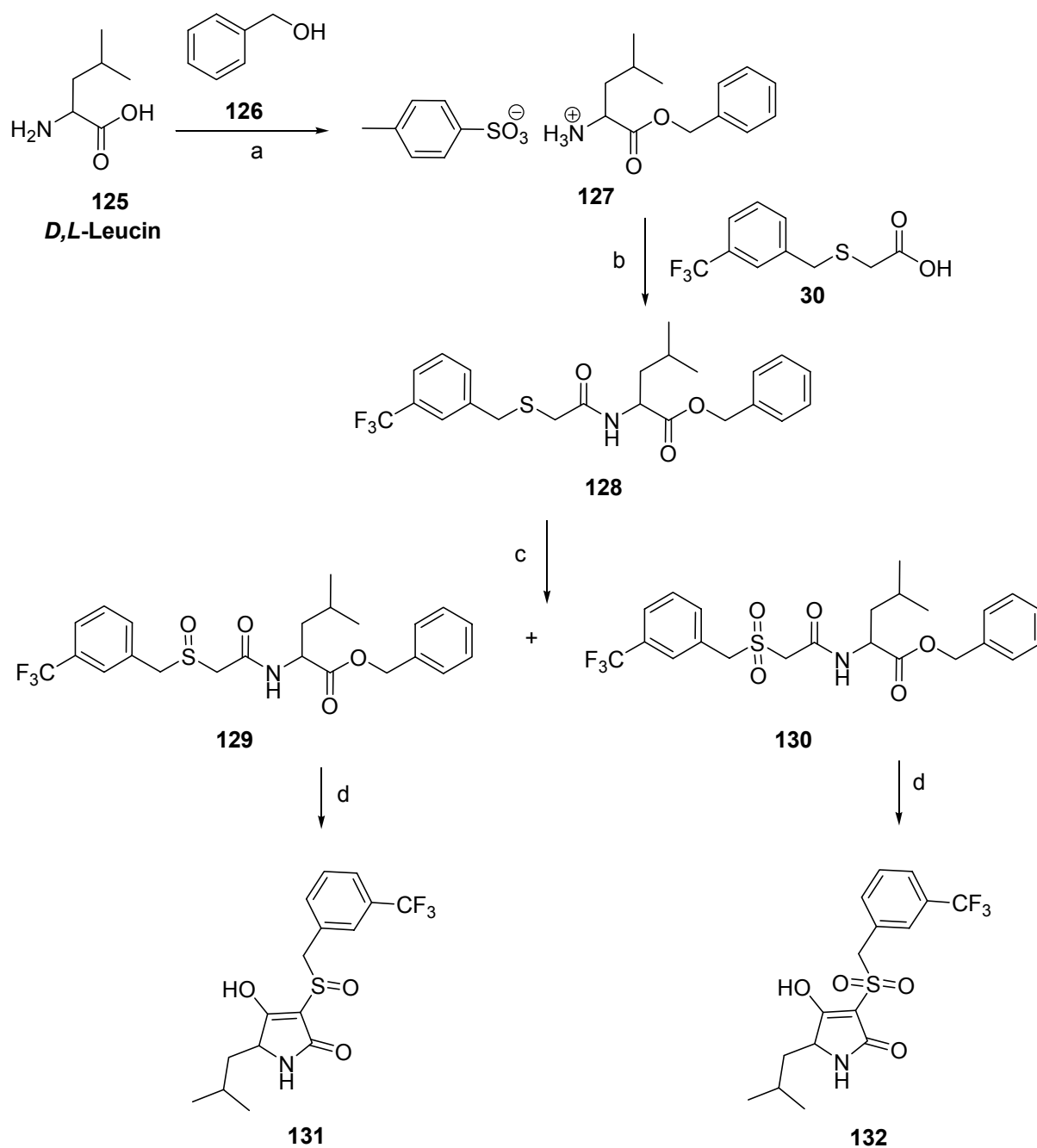


Abbildung 4.7. Strukturen der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124**.

4.2.4 Synthese der Sulfotetramsäuren **131** und **132**

Sulfoxide werden am häufigsten durch eine Oxidation von Sulfiden mit Persäuren, *tert*-BuOOH oder H₂O₂ hergestellt. Man erhält sie chemoselektiv, wenn man ein Äquivalent des betreffenden Oxidationsmittels einsetzt. Zu Sulfonen gelangt man aus den gleichen Sulfiden ebenso chemoselektiv, nur muss man zwei Äquivalente der gleichen Oxidationsmittel einsetzen. Die Oxidationen laufen beide nach dem gleichen Muster ab: das Schwefelatom reagiert als Nukleophil in einer S_N2-artigen Substitutionsreaktion mit einem Sauerstoffatom der O-O-Bindung von einer Persäure oder H₂O₂ (Schema 4.8).^[236]

Als Oxidationsmittel bei der vorliegenden Herstellung der Sulfotetramsäuren **131** und **132** diente die Peroxysäure *m*CPBA. Ausgehend von *D,L*-Leucin wurde zunächst der Benzylester **127** hergestellt. Dieser konnte unter Verwendung der EDAC/HOBt-Kupplungsreagenzien mit der Thioessigsäure **30** verknüpft und anschließend mit 1.2 Äquivalent ungereinigter 70%iger *m*CPBA bei -50°C oxidiert werden. Dabei verlief die Reaktion keinesfalls chemoselektiv. Als Reaktionsprodukt wurde ein entsprechendes 1:2 Gemisch des Sulfoxids **129** und des Sulfons **130** identifiziert, welches mittels Flash-Säulenchromatographie aufgetrennt werden konnte. Sowohl Sulfoxid als auch Sulfon sind interessante Strukturtypen, die beide die Möglichkeit bieten, als Wasserstoffbrücken-Akzeptor Interaktionen mit Aminosäuren einzugehen. Auf die Ausarbeitung von selektiven Oxidationsbedingungen konnte deshalb verzichtet werden. Durch abschließende Reaktion der Verbindungen **129** und **130** mit KOBu^t in THF konnten die beiden Sulfotetramsäuren **131** (1:1 Diastereomeren-gemisch) und **132** (racemisch) mit moderaten Ausbeuten erhalten werden (Schema 4.8).



Schema 4.8. Synthese der Sulfotetramsäuren **131** und **132**. Reagenzien und Bedingungen: (a) *p*-Toluolsulfonsäure, Toluol, Rückfluss, 14 h, (b) EDAC, HOBt, TEA, DCM, RT, 20 h, (c) *m*CPBA, DCM, -50°C, 1 h, (d) KOBu^t, THF, Rückfluss, 1 h.

4.3 Biologische Aktivität & Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Die Aktivitätsbestimmungen der synthetisierten Tetram- und Tetronsäuren wurden von Dr. Manfred Brockhaus, einem Mitarbeiter der Firma Hoffmann-La Roche, durchgeführt. Mittels eines „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET) Assays^[237,238] konnten die IC_{50} -Werte der einzelnen Verbindungen bestimmt werden. Bei einem IC_{50} -Wert handelt es sich um die „mittlere inhibitorische Konzentration“. Es ist die Konzentration des Antagonisten, bei der 50% der maximalen Hemmung erreicht werden. Der IC_{50} hat somit Aussagekraft über die Stärke der Affinität einer Verbindung gegenüber dem Enzym. Je kleiner der bestimmte Wert des IC_{50} ist, desto stärker ist folglich seine Interaktion mit dem Rezeptor. Über die IC_{50} -Werte kann die biologische Aktivität verschiedener Verbindungen aus einer Serie miteinander verglichen werden.

FRET ist eine distanzabhängige Interaktion zwischen den elektronisch angeregten Zuständen zweier Farbstoffmoleküle, bei welcher die Anregung von einem Donor auf ein Akzeptormolekül übertragen wird, ohne dass Strahlung bei dieser Übertragung frei wird. Anhand von Emission der übertragenen Energie bei der Akzeptorwellenlänge kann ein solches FRET-Paar analysiert werden.

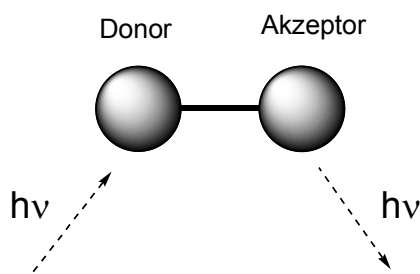


Abbildung 4.8. Prinzip von FRET. Ein Donor-Fluorophor wird bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Diese Donorgruppe überträgt die Anregungsenergie zu einem in unmittelbarer Nähe befindlichen Akzeptormolekül. Emission erfolgt bei der Akzeptorwellenlänge und kann gemessen und analysiert werden.

Alle FRET-Assays wurden bei 20°C in einem FLUOstar der Firma BMG Lab Technologies (D-77656 Offenburg) unter Verwendung von „96-well“ Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Assayvolumen betrug jeweils 100 μ l. Die zu testenden Tetram- und Tetronsäuren wurden in DMSO gelöst und in die für sie vorgesehenen „wells“ gegeben und mit dem verwendeten Puffer (Natriumacetat, pH 4.5) und dem Enzym („full length“ BACE1) versetzt. Nach Zugabe des Substrats wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Der Verlauf des Fluoreszenzanstiegs konnte bei einer

Wellenlänge $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ mit einer Fluoreszenzanregung bei $\lambda_{\text{Anregung}} = 430 \text{ nm}$ gemessen werden. Als Substrat wurde ein dem natürlichen Substrat entsprechendes Peptid verwendet. Es beinhaltet 10 Aminosäuren im Zentrum und jeweils eine weitere Aminosäure an den Enden, die als Verknüpfungspunkte zu den Fluoreszenzgruppen „Lucifer yellow“ und „Dabsyl“ dienen (Abb. 4.9).

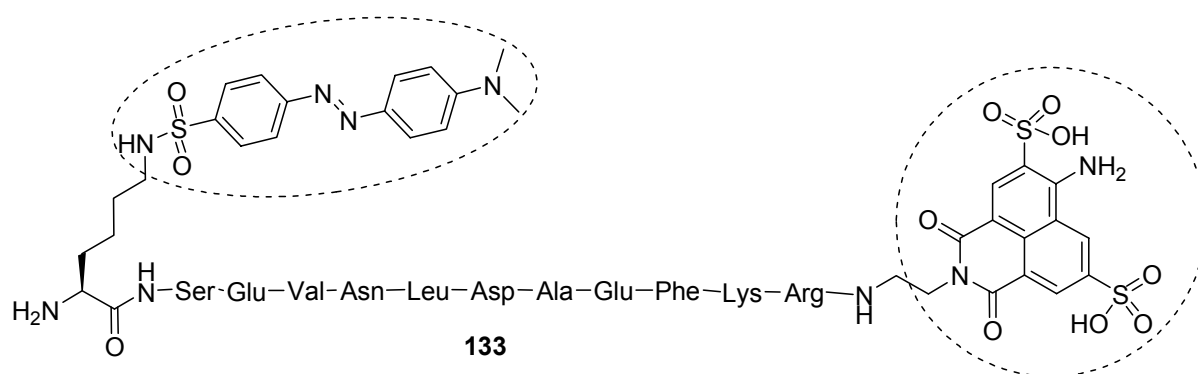


Abbildung 4.9. Struktur des Substrats Lucifer yellow-SEVNLDAEFKR-Dabsyl **133**.

Die Ergebnisse des FRET-Assays sind den Tabellen 4.1 und 4.2 zu entnehmen. Vergleicht man die Aktivitäten der Tetramsäuren, so lässt sich daraus relativ schwer ein klarer Trend für eine Struktur-Aktivitätsbeziehung ableiten. Tetramsäuren, die eine *meta*-Trifluormethylaryl-Gruppe als Substituent auf der „rechten“ Seite tragen, zeigen die höchsten Aktivitäten. Allerdings sind Tetronsäuren vom gleichen Typ weniger aktiv.

In Abbildung 4.10 sind Strukturen mit den entsprechenden IC_{50} -Werten einiger ausgewählter Beispiele von Roche aufgeführt.^[223] Das Substitutionsmuster der „linken“ Seite ist vergleichbar mit dem der in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen. Aus dem natürlichen Substrat ist bekannt, dass ein Leucin-Rest die S_1 -„Tasche“ des aktiven Zentrums besetzt, was im Erscheinungsbild der „linken“ Seite erkennbar wird.

Die Substituenten der „rechten“ Seite sind größtenteils von größerer Kettenlänge als die selbst synthetisierten. Sie bieten demnach bessere Möglichkeiten mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums von BACE1 zu interagieren. Eine Tatsache, die für die Synthese weiterer Verbindungen berücksichtigt werden sollte.

Es ist auffällig, dass alle Roche-Substanzen anstelle eines Thioether-Motivs eine Carbonylfunktion besitzen, über welche Wasserstoffbrückenbindungen geknüpft werden können, die zur Aktivität beitragen. Die Sulfotetramsäuren **130** und **131**

wurden aus demselben Grund hergestellt. Im Vergleich zu ihren Vorläufermolekülen konnte die Aktivität allerdings nicht gesteigert werden.

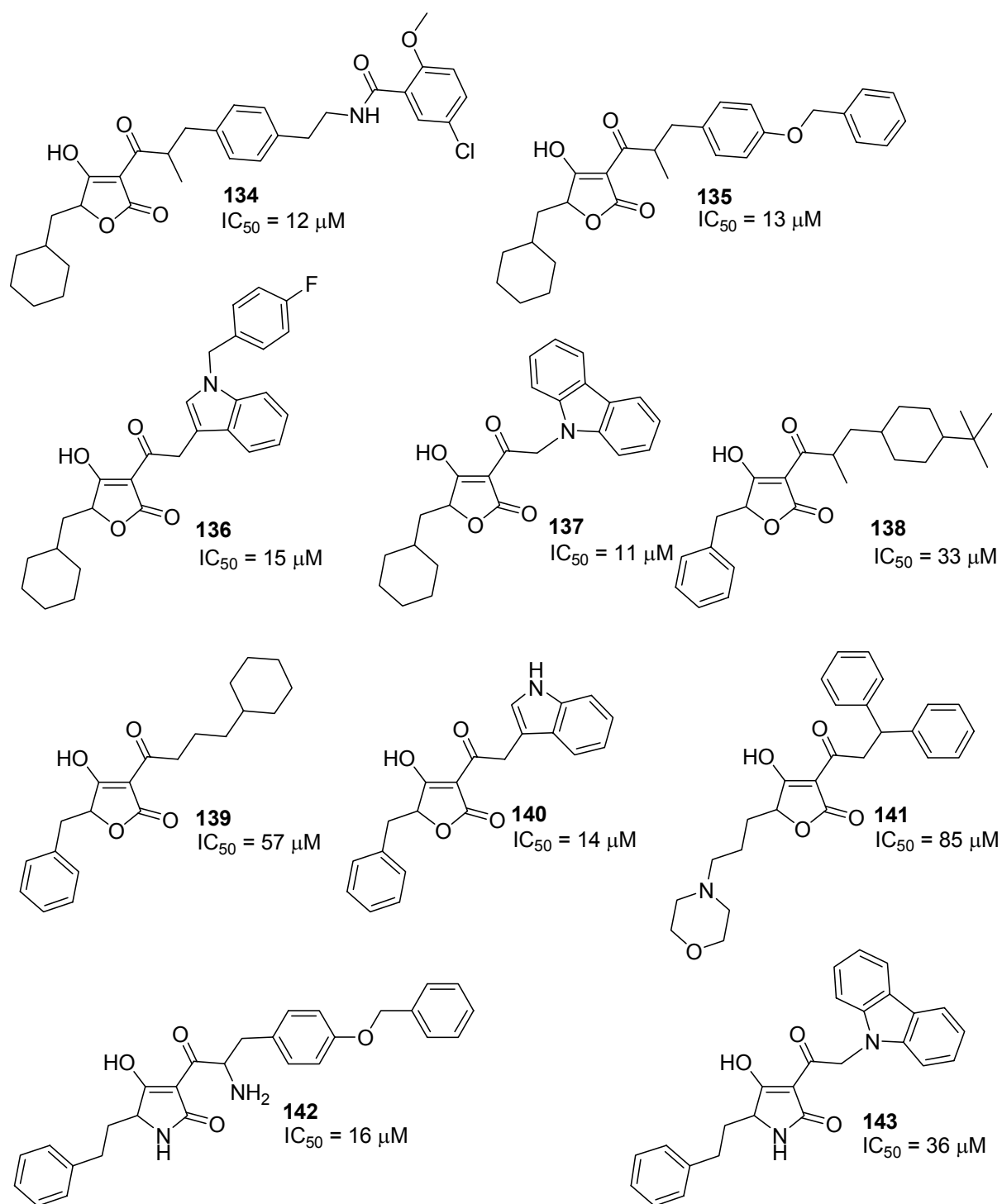


Abbildung 4.10. Ausgewählte Beispiele von Tetron- und Tetramsäuren aus dem Roche-Patent.^[223]

Über die festphasenunterstützten Synthesen konnten die aktiven Verbindungen **44** und **57** nicht mit gewünschter Reinheit erhalten werden. Die unklare Struktur-Aktivitätsbeziehung lässt sich vielleicht auch auf diese Tatsache zurückführen.

Die Serie der *N*-substituierten Tetramsäuren liefert einheitlichere Ergebnisse. Verbindungen, welche ein CH₂-CH₂-Aryl- und ein CH₂-Aryl-Substitutionsmuster besitzen, haben die höchsten Aktivitäten. Die absolute Position dieser beiden Gruppen scheint unwichtig zu sein, was entweder für einen allosterischen Inhibitionsmechanismus oder für zwei Orientierungsmöglichkeiten im aktiven Zentrum spricht.

Substanz	Ausbeute (%) ^a	Reinheit (%) ^b	FRET IC ₅₀ [μM]	Substanz	Ausbeute (%) ^a	Reinheit (%) ^b	FRET IC ₅₀ [μM]
43	26	99	inaktiv	65	30	68	inaktiv
44	48	40	194	66	35	98	inaktiv
45	56	83	inaktiv	67	32	97	inaktiv
46	45	96	inaktiv	68	38	99	inaktiv
47	45	76	inaktiv	69	45	100	inaktiv
48	42	85	inaktiv	70	57	63	inaktiv
49	37	80	200	71	50	95	inaktiv
50	45	68	inaktiv	72	45	94	inaktiv
51	38	39	inaktiv	73	63	74	inaktiv
52	25	76	inaktiv	74	54	83	inaktiv
53	42	99	inaktiv	75	60	70	145
54	40	98	inaktiv	76	62	70	inaktiv
55	45	98	inaktiv	77	54	83	inaktiv
56	30	100	inaktiv	78	35	75	inaktiv
57	27	58	60	79	40	98	inaktiv
58	21	62	inaktiv	80	42	98	inaktiv
59	49	93	inaktiv	81	45	98	inaktiv
60	25	79	inaktiv	82	36	99	inaktiv
61	23	98	inaktiv	83	35	98	inaktiv
62	31	76	200	84	38	98	inaktiv
63	45	68	>200	85	40	98	inaktiv
64	27	70	inaktiv				

Tabelle 4.1. Ausbeute, Reinheit und Aktivität der Tetramsäuren **43-85**. ^aGesamtausbeute der Rohprodukte, ohne weitere Aufreinigung. ^bHPLC-Reinheit, Wellenlängendetektion bei 254 nm.

Substanz	Ausbeute (%) ^a	Reinheit (%) ^b	FRET IC ₅₀ [μ M]	Substanz	Ausbeute (%) ^a	Reinheit (%) ^b	FRET IC ₅₀ [μ M]
95	17	100	105	116	13	88	184
96	13	98	inaktiv	117	13	100	258
97	12	63	>200	118	18	76	265
98	17	90	inaktiv	119	10	100	241
99	15	98	>200	120	14	84	459
100	13	98	>200	121	12	88	424
110	15	96	inaktiv	122	15	91	212
111	19	100	inaktiv	123	13	62	139
112	34	95	>200	124	12	73	>200
113	15	94	inaktiv	130	60	95	>200
114	14	95	>200	131	68	100	>200
115	16	100	212				

Tabelle 4.2. Ausbeute, Reinheit und Aktivität der Tetronsäuren **95-100**, der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124** und der Sulfotetramsäuren **130** und **131**. ^aGesamtausbeute der Rohprodukte, ohne weitere Aufreinigung. ^bHPLC-Reinheit, Wellenlängendetektion bei 254 nm.

4.4 Schlussfolgerung & Ausblick

Mittels der in dieser Arbeit entwickelten festphasenunterstützten Synthesen konnten verschiedene Tetram-, Tetron- und *N*-substituierte Tetramsäuren erfolgreich hergestellt werden. Wie vermutet, waren einige dieser nicht-peptischen Verbindungen in der Lage, BACE1 im mikromolaren Bereich zu inhibieren. Besonders günstig sind dabei vor allem die guten pharmakologischen Eigenschaften der aktivsten Verbindungen. So liegt der clogP und die PSA von Substanz **123** (clogP = 3.85, tPSA = 77) beispielsweise in einem für das Erreichen des Zentralnervensystems geeigneten Bereich.

Ein clogP \leq 5 gewährleistet erfahrungsgemäß eine gut orale Verfügbarkeit. Es handelt sich dabei um einen Verteilungskoeffizienten zwischen einem Wasser/*n*-Octanol Phasenübergang.^[199] Besitzt die Substanz einen Wert mittlerer Lipophilie, so können sowohl hydrophile als auch hydrophobe Phasen durchdrungen werden, um zum Wirkungsort zu gelangen. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung, wenn Medikamente oral verabreicht, durch das Blut transportiert werden und gleichzeitig die Blut-Hirn-Schranke durchschreiten sollen.

Die tPSA (*topological polar surface area*) stellt ein Maß für die Polarität der Moleküloberfläche dar. Je nachdem aus welchen Atomen ein Molekül zusammengesetzt ist, wird die tPSA in die eine oder andere Richtung beeinflusst.

Um die natürliche Barriere zwischen Blut und Hirn übertreten zu können, sollte die *t*PSA in einem Bereich $\leq 100 \text{ \AA}^2$ liegen.

Die Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Tetramsäuren **43-85** und Tetronsäuren **95-100** liefert keine schlüssigen Ergebnisse. Erfolgreicher gestaltet sich die Auswertung bei der Reihe der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124**. Es hat den Anschein, dass die Substituenten des Schwefelatoms mit den Aminosäuren Tyr₁₉₈, Tyr₇₁ und Arg₁₂₈ interagieren, welche die S₂'-Tasche von BACE1 bilden. Für die Synthese neuer Tetramsäure-Derivate könnte durch Einbau eines aromatischen Substituenten mit einem Wasserstoffbrücken-Akzeptor am Ring die Aktivität gesteigert werden. Unter Umständen ist es außerdem hilfreich, den Schwefel durch einen Stickstoff auszutauschen, der die Alkylkette verkürzt und für eine weitere Interaktionsmöglichkeit sorgt. Die in dieser Arbeit hergestellten *N*-substituierten Tetramsäuren besitzen keinen R₂-Substituenten (Abb. 4.11), der mit den Aminosäuren der S₁-pocket in Wechselwirkung treten kann. Zur Aktivitätssteigerung ist die Einführung einer unpolaren Gruppe an dieser Position deshalb besonders ratsam.

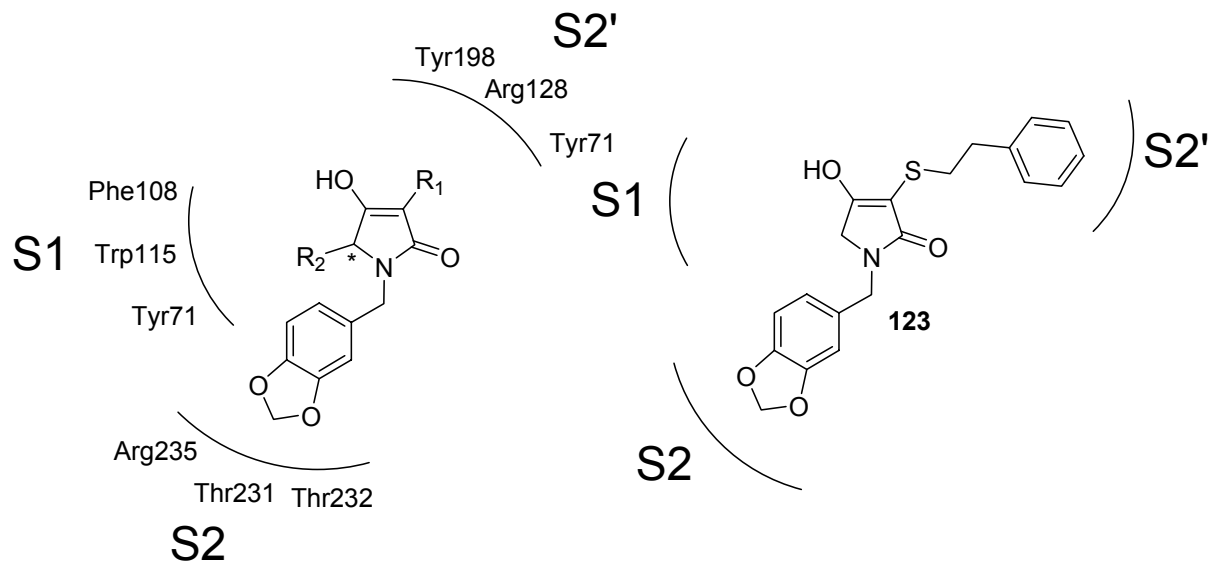


Abbildung 4.11. Vermutete Interaktionen der *N*-substituierten Tetramsäuren.

Ein dreidimensionales Modell der vermuteten Interaktionen von Verbindung **123** mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums ist der Abbildung 4.12 zu entnehmen.

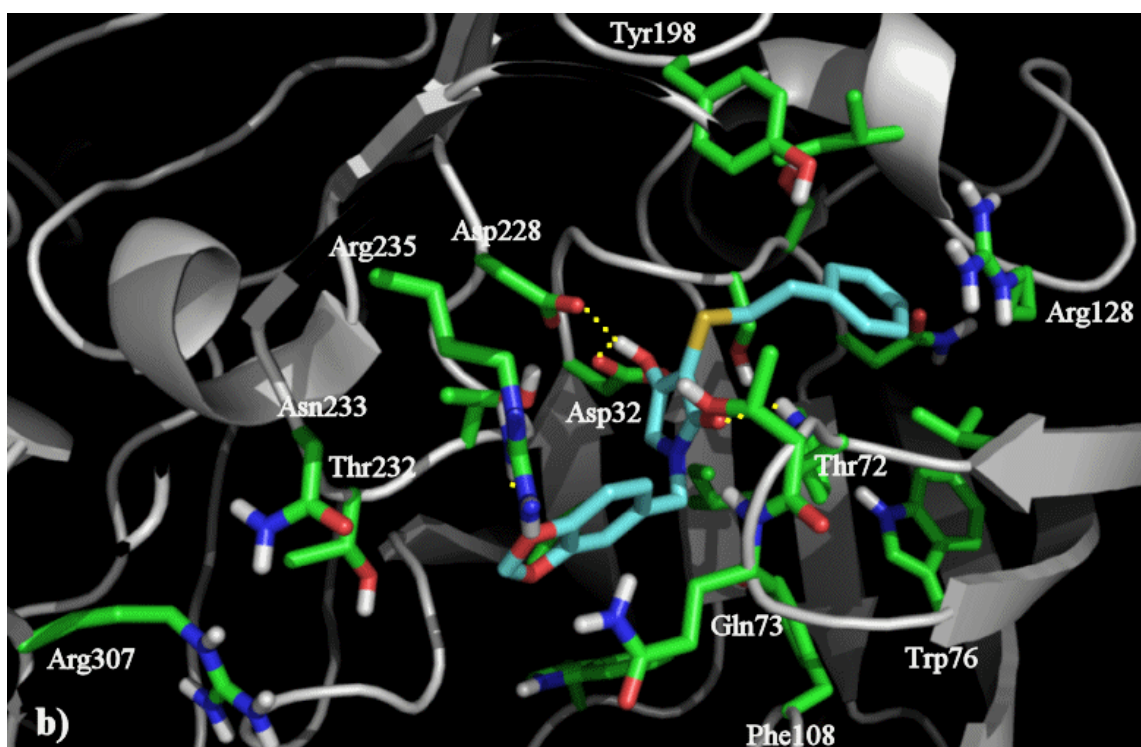


Abbildung 4.12. „Docking“ von Verbindung **123** in die aktive Tasche von BACE1. Zur Verfügung gestellt von Luciana Marinelli, Software: AutoDock.

5 Design von Presenilin1-Inhibitoren durch Asparaginsäureaktivierung

5.1 Einleitung

„Alzheimer’s disease (AD) is a devastating illness that robs humans of their ability to remember, to think and to understand, all the things we cherish most about being human” (P. F. Chapman).

Der zu beobachtende Verlust von Neuronen in der AD wird stets von der Entstehung Amyloider Plaques begleitet. Diese wiederum sind Folge einer erhöhten Bildung des neurotoxischen Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) durch die Prozessierung von BACE1 und des γ -Sekretase-Quartetts. Ein detailliertes Verständnis der $A\beta$ -Bildung, der anschließenden Aggregation zu den Amyloiden Plaques und der Konsequenzen, die diese Ablagerungen für den Krankheitsverlauf haben, sind deshalb für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten von größtem Interesse.^[239-241]

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die beiden homologen Preseniline PS1 und PS2 von besonderer Bedeutung für die Aktivität der γ -Sekretase sind. Dies wurde evident, nachdem ein genetischer Zusammenhang zwischen den Presenilinen und familiärer Formen der AD identifiziert werden konnte.^[242] De Strooper et al. zeigten in PS1 *knockout* Experimenten außerdem, dass eine $A\beta$ -Bildung reduziert wird.^[243] Bei einer zusätzlichen Ausschaltung des zweiten Presenilin Gens (PS2) wurde sogar keinerlei $A\beta$ -Entstehung beobachtet.^[244, 245]

Die Identifizierung zweier für die Funktion des Enzyms bedeutender Asparaginsäuren innerhalb der transmembranen Domäne (TMD) 6 und 8 deutet darauf hin, dass die Preseniline das katalytisch wirksame Zentrum des γ -Sekretase-Quartetts bilden.^[87]

Im Gegensatz zu BACE1 und allen anderen konventionellen Aspartylproteasen fehlt den Presenilinen allerdings die D(T/S)G(T/S) typische Anordnung des aktiven Zentrums. Stattdessen besitzen sie ein GxGD-Motiv in unmittelbarer Nähe zur Asparaginsäure auf der TMD 8.^[246,247] Das Vorhandensein dieses Strukturelements bei anderen transmembranen Enzymen (Type-4 Prepilin Peptidasen, Signal Peptide

Peptidasen) deutet eventuell auf eine evolutionäre Weiterentwicklung zu neuen aktiven Zentren hin, um das Problem einer Proteolyse innerhalb der Membran lösen zu können.^[92]

Heute hat sich die Ansicht, dass es sich bei PS1 und PS2 um einen neuen Typ transmembraner Aspartylproteasen handelt, weitestgehend etabliert. Die Entwicklung von selektiven, irreversiblen Inhibitoren, die durch Asparaginsäure aktiviert werden, würde diese Ansicht weiter unterstützen. Da die Struktur der γ -Sekretase bislang weder mittels NMR-Techniken noch mittels Kristallstrukturanalyse untersucht werden konnte, eröffnen solche säurelabilen irreversiblen Inhibitoren außerdem die Chance neue Erkenntnisse über den Aufbau des aktiven Zentrums bzw. des Enzyms zu erhalten.

5.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen

Trotz fehlender Informationen über den Aufbau des aktiven Zentrums der γ -Sekretase, konnte in den letzten Jahren eine große Bandbreite an kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitoren entdeckt werden.^[80] Die Strukturen von DAPT (**13**) und LY411575 (**14**) gehören dabei mit Sicherheit zu den am besten pharmakologisch untersuchten. Für die Entwicklung von irreversiblen Antagonisten erscheint es deshalb sinnvoll, die bekannten Struktur-Aktivitätsbeziehungen dieser beiden Verbindungen auszunutzen und das dipeptidische Rückgrat Alanin-Phenylglycin als Basis potentieller irreversibler Inhibitoren zu verwenden.

Obgleich DAPT für zahlreiche pharmakologische Studien eingesetzt wurde, bleibt der genaue Wirkmechanismus unklar. Der Einbau säurelabiler Gruppen an verschiedenen Positionen dieser Ala-Phg-Grundstruktur könnte neue Aufschlüsse über die Interaktion mit der γ -Sekretase liefern.

Diazoketone sind Strukturtypen, die sehr oft zur irreversiblen Inhibition von Cysteinproteasen eingesetzt werden. Die katalytisch aktive Mercaptogruppe (SH) greift dabei das Diazoketon nukleophil an, wodurch es zu einer irreversiblen Alkylierung kommt. Im vorliegenden Projekt sollen solche Diazoverbindungen stattdessen zur irreversiblen Inhibition des Presenilin1 eingesetzt werden. Es wird angenommen, dass z.B. eine Asparaginsäure des aktiven Zentrums in der Lage ist, das N₂-CHR-Motiv zu protonieren. Dies hätte wiederum den Verlust von

elementarem Stickstoff (N_2) zur Folge, wodurch sich ein hoch reaktives RCH_2^+ -Carbokation bildet, welches als gutes Elektrophil wichtige katalytische Funktionen alkylieren kann. Durch Einbau einer säurelabilen Diazogruppe ist deshalb die irreversible Inhibition von PS1 denkbar.

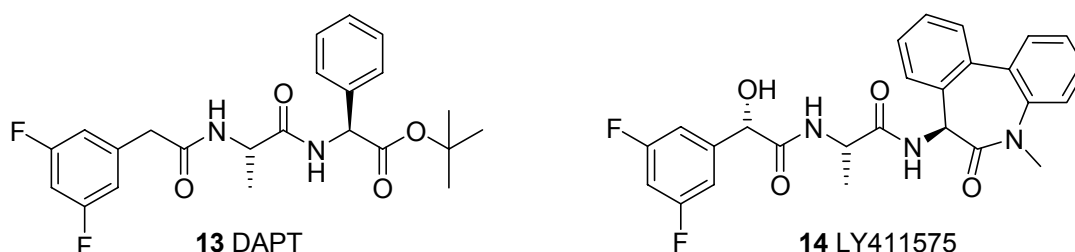
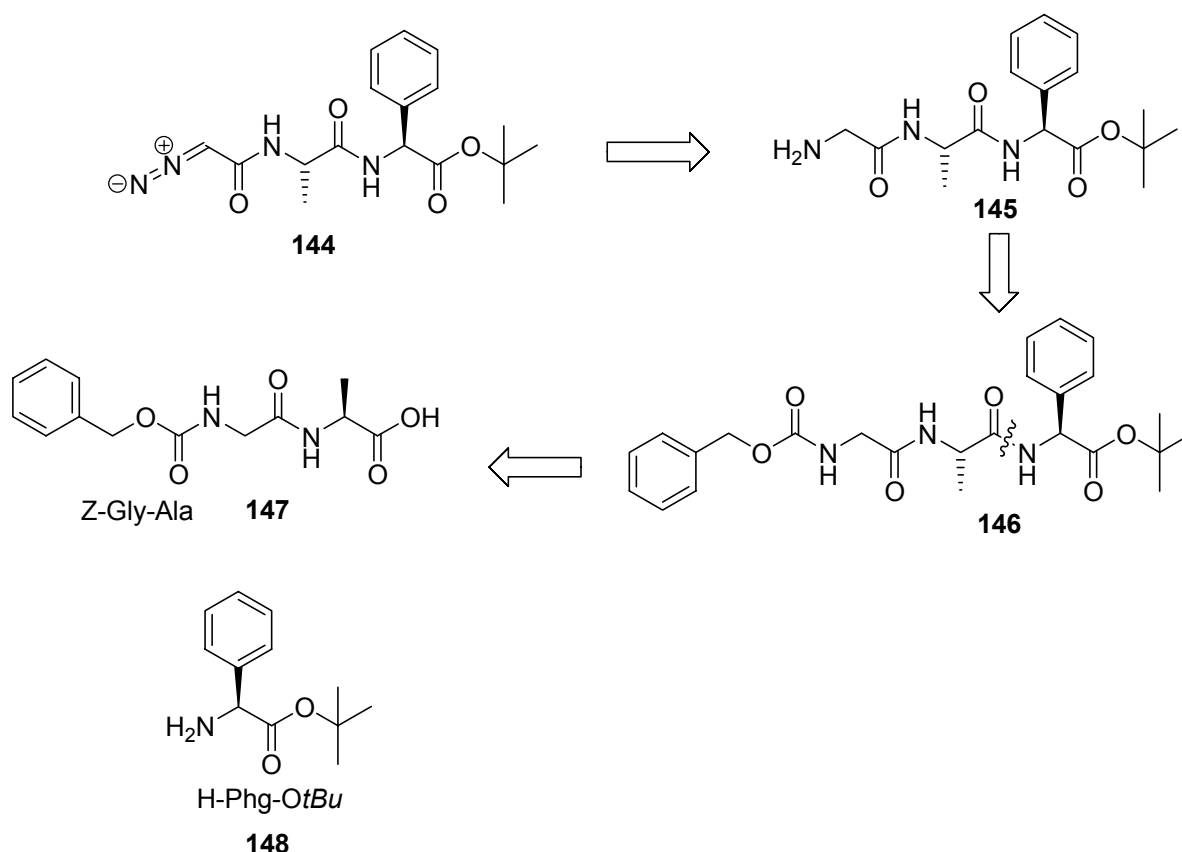


Abbildung 5.1. Strukturen der potenten γ -Sekretase-Inhibitoren DAPT (**13**) und LY411575 (**14**).

Vergleicht man die Strukturen von DAPT (**13**) und LY411575 (**14**) (Abb. 5.1) mit den zugehörigen Aktivitäten (20 nM für **13**, <1 nM für **14**), so hat es den Anschein, dass die bei Verbindung **14** zusätzlich vorhandene Hydroxylgruppe über hydrophile Interaktionsmöglichkeiten einen großen Beitrag zur gesteigerten Aktivität liefert. Eine direkte Wechselwirkung dieser Funktionalität mit den Asparaginsäuren des aktiven Zentrums liegt nahe, weshalb die Einführung einer Diazogruppe in das Ala-Phg-Grundgerüst auf der *N*-terminalen Seite des Moleküls sinnvoll erscheint. Eine für dieses Vorhaben mögliche Retrosynthese ist dem Schema 5.1 zu entnehmen. Besondere Schwierigkeit liegt hierbei vor allem in der Einführung der Diazogruppe im letzten Schritt. Als Startmaterialien kommen Z-geschütztes Glycin-Alanin (**147**) und der *tert*-Butylester von Phenylglycin (**148**) in Frage. Diese können über Standardpeptidkupplungen verknüpft werden.

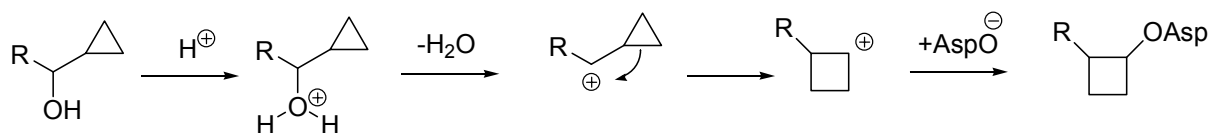
Wie bereits erwähnt wurde, ist die genaue Interaktion von DAPT mit der γ -Sekretase unbekannt. Zur Untersuchung der Wirkungsweise erscheint deshalb die Synthese von Verbindungen mit säurelabilen Gruppen am C-Terminus ebenfalls sinnvoll.

Obgleich die pH-Wert-Abhängigkeit und das individuelle pH-Optimum der Preseniline bekannt ist, bleiben die pH-Werte in bestimmten Bereichen des Enzyms unklar. Gerade die Verhältnisse im aktiven Zentrum sind von großem Interesse. Untersucht man die pH-Wert-Abhängigkeit verschiedener säurelabiler Verbindungen in einem wässrigen Testsystem, so kann diese mit dem relativen pH-Wert der enzymatischen Spaltung der Preseniline in Verbindung gebracht werden.



Schema 5.1. Retrosynthese von DiazoDAPT **144**.

Von Cyclopropanmethanolen ist bekannt, dass sie unter Säurekatalyse zu Cyclobutylkationen umlagern (Schema 5.2), welche leicht alkylieren. Durch Veresterung verschiedener Cyclopropanmethanole mit dem DAPT-Rückgrat besteht die Möglichkeit zur irreversiblen Inhibition von PS1, vorausgesetzt der pH-Wert ist ausreichend, um diese Cyclopropanmethanole freizusetzen und zu protonieren.



Schema 5.2. Umlagerung von protoniertem Cyclopropylmethanol zu einem Cyclobutylkation als Testmöglichkeit für die Säuresensitivität möglicher Presenilin-Inhibitoren.

In Abbildung 5.2 sind sechs Verbindungen dargestellt, die für dieses Vorhaben hergestellt werden sollten. Ausgehend von der bekannten Synthese für DAPT^[105],

anschließender Hydrolyse des *tert*-Butylesters und abschließender Kupplung mit den verschiedenen Cyclopropanmethanolen sollte die Synthese gut durchführbar sein.

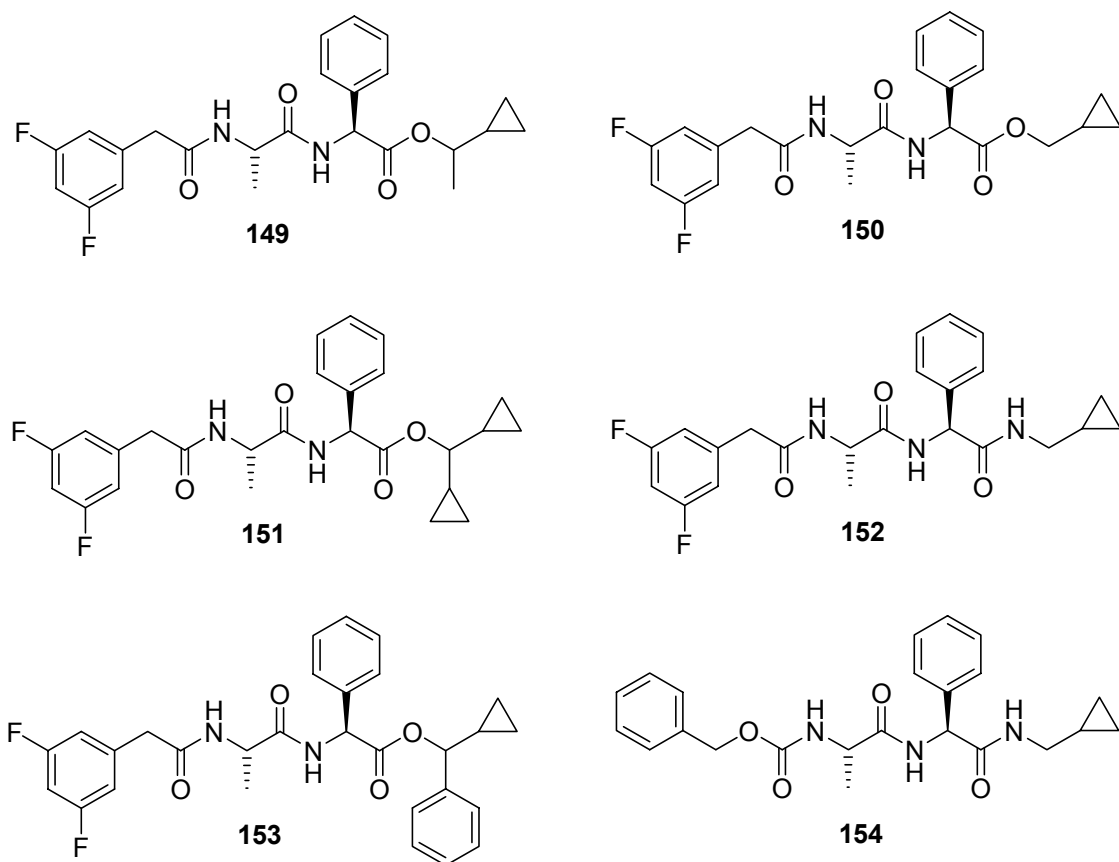


Abbildung 5.2. Strukturen der DAPT-analogen Verbindungen **149-154** mit säurelabiler Gruppe am C-Terminus.

5.3 Synthese

Die Synthese von DiazoDAPT **144** ist im Schema 5.3 dargestellt. Das kommerziell erhältliche *N*-terminal-geschützte Dipeptid Z-Gly-Ala **147** wurde über Standard EDAC/HOBt-Kupplungsbedingungen mit dem Hydrochlorid der C-terminal geschützten Aminosäure H-Phg-O*t*Bu **148** in fast quantitativer Ausbeute verknüpft. Nach anschließender reduktiver Entschützung von Verbindung **146** konnte das Tripeptid **145** in 90%iger Ausbeute erhalten werden (Schema 5.3).

Diazocarbonylverbindungen werden häufig als Vorläufermoleküle zur Synthese von Carbenen eingesetzt. Unter Wärmeeinwirkung können sie relativ leicht gasförmigen Stickstoff verlieren und dadurch die instabilen Carbene bilden, die sofort weiterreagieren. Die elektronenziehende Carbonylfunktion stabilisiert den Diazodipol, so dass dieser Stickstoffverlust nicht schon bei Raumtemperatur eintritt (Abb. 5.3).

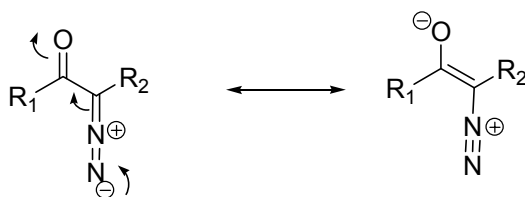


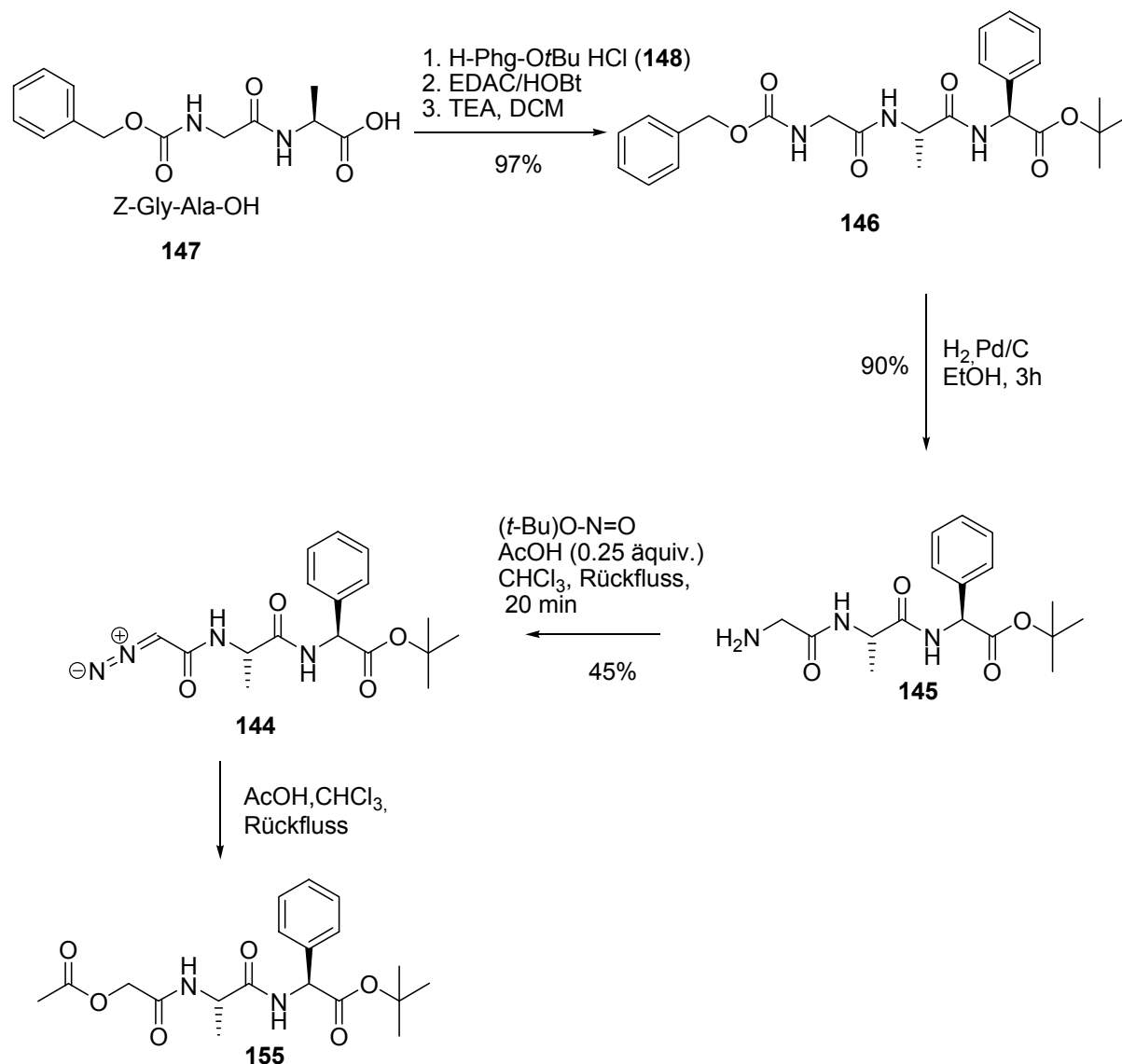
Abbildung 5.3. Stabilisierung des Diazodipols durch die Carbonylfunktion.

Zur Herstellung von solchen Diazocarbonylverbindungen findet man zwei Standardverfahren.^[248] Zum einen wird die Reaktion von Carbonsäurechloriden mit Diazomethan beschrieben, zum anderen kommen so genannte Diazo-Transfer-Reagenzien wie Tosylazid zur Anwendung.^[249]

In einer von Takamura et al. beschriebenen Variante wird die Synthese von Diazocarbonylverbindungen durch Isoamylnitrit unter Verwendung von katalytischen Mengen von Essigsäure in Chloroform erreicht.^[250] Außerdem gibt es Strategien, die eine Kupplung von Diazoessigsäure-Verbindungen mit Aminen anwenden.^[251,252]

Für das vorliegende Syntheseproblem schien eine Modifizierung der Takamura-Variante am sinnvollsten zu sein (Schema 5.3). Durch vorsichtiges Erwärmen von Amin **145** in Gegenwart von (*t*-Bu)O-N=O und katalytischen Mengen Essigsäure in Chloroform für ca. 20 min wurde DiazoDAPT **144** in 45%iger Ausbeute erhalten. Die Reaktionszeit muss vorsichtig gewählt werden, da bei zu langem Erhitzen die gewünschte Verbindung wie beschrieben unter Stickstoffverlust zerfallen kann. Zu

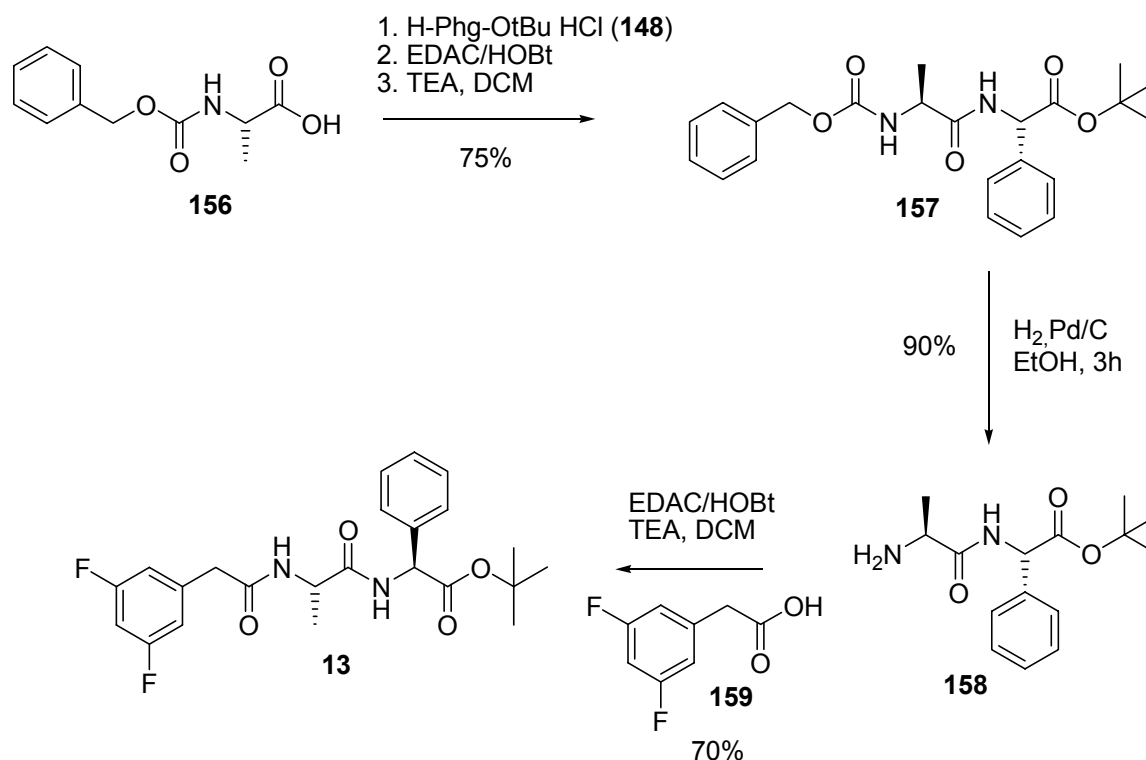
hohe Konzentrationen von Essigsäure führen außerdem zur Bildung des Depsipeptids **155**.



Schema 5.3. Synthese von DiazoDAPT **144**.

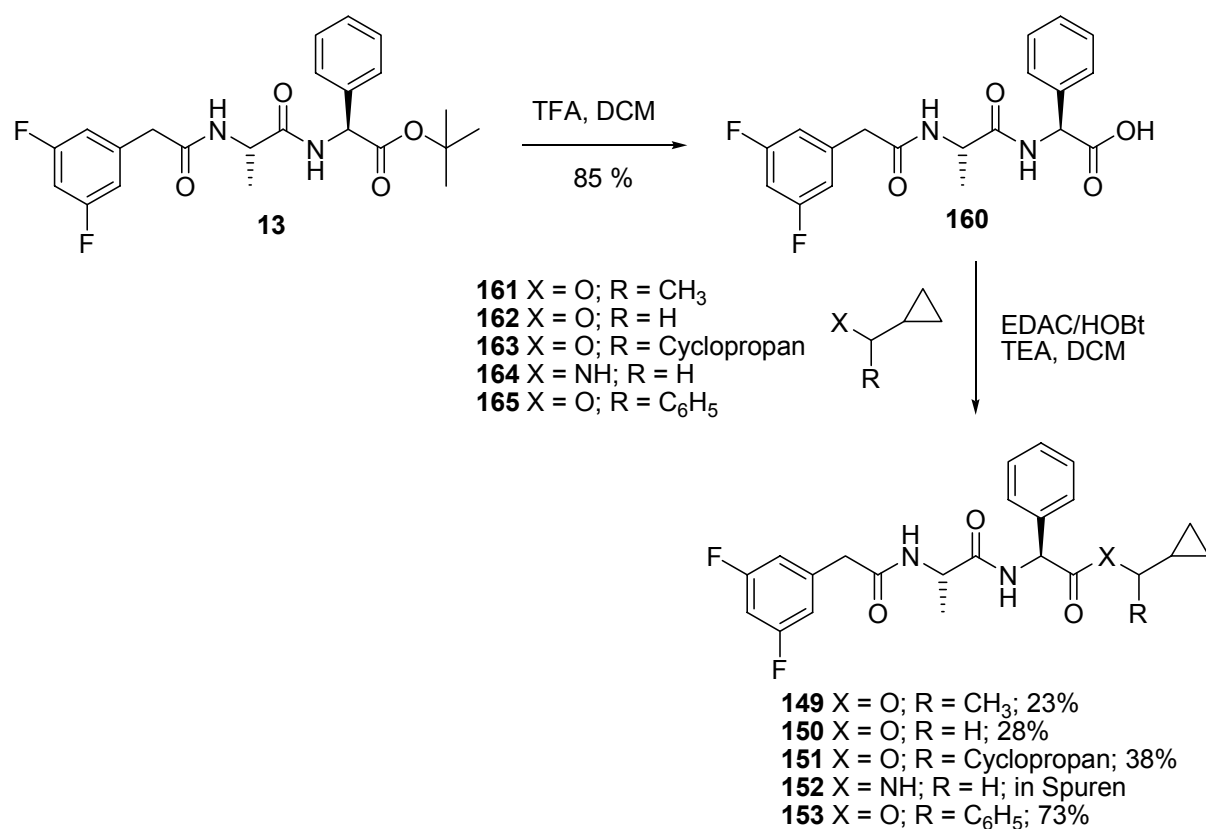
Die Herstellung der verschiedenen C-terminal funktionalisierten DAPT-Verbindungen begann zunächst mit der dreistufigen Synthese von DAPT **13** (Schema 5.4). Z-Ala-OH wurde über die EDAC/HOBt-Methode mit dem Hydrochlorid von H-Phg-OtBu in 75%iger Ausbeute verknüpft, anschließend von der Schutzgruppe befreit und letztendlich mit der Säure **159** unter EDAC/HOBt-Bedingungen in 70% Ausbeute gekuppelt. Durch Einwirkung von TFA in DCM wurde DAPT hydrolysiert. Die so erhaltene DAPT-Säure **160** konnte über die EDAC/HOBt-Bedingungen mit den vier

Cyclopropanalkoholen **161-164** bzw. dem Cyclopropanamin **165** zu den Verbindungen **149-153** mit z. T. allerdings geringen Ausbeuten (23, 28, 38 und 73% für **149**, **150**, **151** und **153**) umgesetzt werden. Alternative Kupplungsreagenzien wurden getestet (PyBoP, PyBroP), doch ohne erkennbare Verbesserung der Ausbeuten.

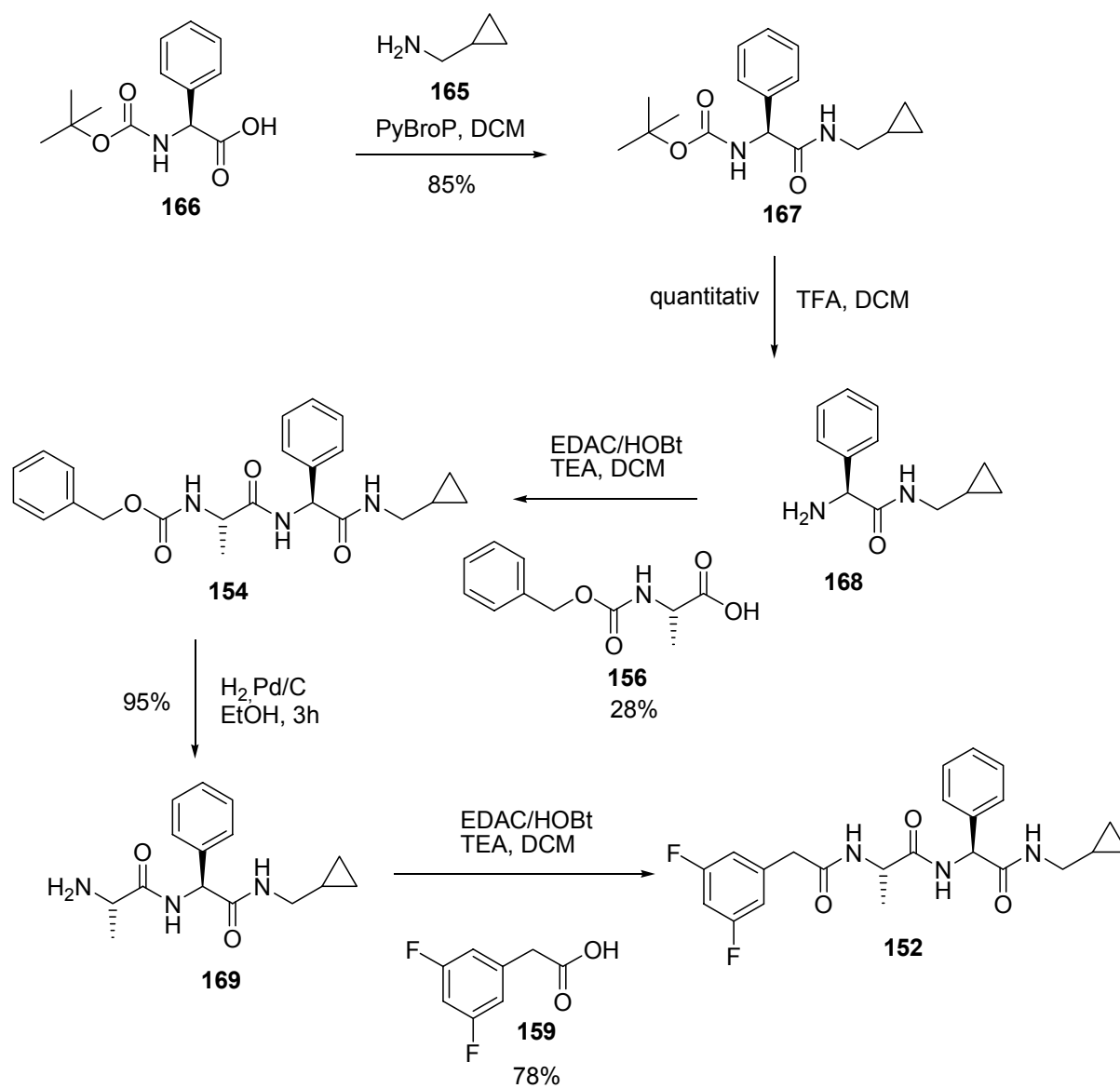


Schema 5.4. Synthese von DAPT (**13**).

Das Cyclopropylamid **152** konnte lediglich in Spuren isoliert werden, weshalb ein anderer Syntheseweg zur Herstellung dieser Verbindung gewählt wurde. Ausgehend von Boc-Phg-OH **166** über Kondensation mit Cyclopropylmethanamin **165** durch Verwendung von PyBroP konnte Boc-Phg-NHR (R = Cyclopropylmethyl) **167** in 85% Ausbeute erhalten werden. Quantitative Boc-Abspaltung mit 10%iger TFA in DCM gefolgt von EDAC/HOBt-Kondensation der resultierenden Säure **168** mit Z-Ala-OH **156** lieferte Verbindung **154** mit 28%iger Ausbeute. Durch abschließende reduktive Entfernung der Z-Schutzgruppe und EDAC/HOBt-Kupplung mit (3,5-Difluorphenyl)-essigsäure **159** wurde Substanz **152** in 78% Ausbeute erhalten (Schema 5.6).



Schema 5.5. Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate **149-153**.



Schema 5.6. Alternative Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT-Verbindung **152**.

5.4 Biologische Aktivität & Inhibitoreigenschaften

Die Unbeständigkeit der Cyclopropylmethyl-Motive der Verbindungen **149-154** gegenüber einer säurekatalysierten Ringumlagerung (Schema 5.2) fällt in der Reihenfolge ihrer Stabilität der Carbokationen **151**, **153** > **149** > **150** >> **152**, **154**. Testexperimente in DCM und der Gegenwart variierender Konzentrationen von Essigsäure und TFA zeigen dieselbe Reihenfolge für die Säurelabilität der Ester-Funktionen. Bei einer Konzentration von 10% TFA wurden die Verbindungen **149-151** und Verbindung **153** innerhalb von 30 Minuten gespalten. Die Kontrollsubstanz **154** blieb unter diesen Bedingungen dagegen stabil.

Die γ -Sekretase-Aktivität aller Verbindungen (außer Verbindung **152**) wurde mittels *de novo* Produktion von AICD (APP *intracellular domain*) *in vitro* verfolgt. Nach einer Vorschrift von Kornilova et al. konnten mit der Schwedischen Mutante veränderte Membranbruchstücke von HEK-29 Zellen hergestellt werden.^[253] Nach Inkubation dieser Zellen mit den entsprechenden Verbindungen **144** und **149-154** (außer **152**) sowie DAPT und dem Inhibitor L-685,458 und anschließender Ultrazentrifugation wurden die löslichen Fragmente mittels SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennt und durch einen Immunoblot mit dem Antikörper 6687 nachgewiesen.^[254]

SDS-PAGE ist eine Variante der Gelelektrophorese, einer analytischen Methode zur Auftrennung von Molekülen im elektrischen Feld. Als Trennmedium der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis, im vorliegenden Fall ein „Tris-Tricine“-Gel der Firma Invitrogen. Zusätzlich kommt SDS zum Einsatz. Dieses anionische Detergens überdeckt die Eigenladungen der Proteine. Die so aufgetrennten Proteine werden über eine Immunodetektion mit dem Antikörper 6687 detektiert.

Die Auswertung der biologischen Tests zeigt ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Verbindungen. Bei der Diazoverbindung **144** sowie der Kontrollsubstanz **154** konnte bis zu Konzentrationen von 100 μ M keinerlei AICD-Hemmung nachgewiesen werden. Dagegen zeigen die Substanzen **149-151** inhibitorische Eigenschaften im nanomolaren Bereich. Bei der Bestimmung zuverlässiger IC₅₀-Werte und einer damit verbundenen aussagekräftigen Rangfolge der verschiedenen Verbindungen treten allerdings Schwierigkeiten auf. Ursache könnte ein zeitabhängiger Inhibitionsmechanismus infolge einer irreversiblen Alkylierung der Aspartate sein. Warum die säurelabile Verbindung **153** allerdings weniger aktiv

erscheint, bleibt fragwürdig. Denkbar ist auch eine zeitabhängige säurekatalysierte Esterspaltung ohne Ringerweiterung. Die so entstehenden DAPT-Säuren müssten letztendlich aber alle die gleiche Aktivität aufzeigen, was in den durchgeführten biologischen Tests definitiv nicht der Fall ist. Als weitere Alternative kommt die Möglichkeit in Frage, dass es sich wie bei DAPT um kompetitive Inhibitoren handelt. Die Unterschiede in den Aktivitäten kommen durch unterschiedlich gute Interaktionen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums zu Stande. Warum allerdings Substanz **153** nahezu kaum die Bildung von AICD inhibiert, ist auch so kaum erklärbar.

Wie bereits erwähnt zeigt DiazoDAPT (**144**) in den durchgeführten biologischen Tests keinerlei Einfluss auf die AICD-Hemmung. Ein Kontakt der Diazogruppe mit einer sauren Aminosäure bleibt somit ausgeschlossen, da dies eine irreversible Alkylierung zur Folge haben müsste. Die Annahme, dass die sekundäre Hydroxyfunktion in LY411575 (**14**) mit den katalytisch wirksamen Asparaginsäuren interagiert, wird somit hinfällig.

Ogleich durch die Auswertung der biologischen Tests viele Fragen unbeantwortet bleiben, so können trotzdem einige neue Erkenntnisse getroffen werden. Der Austausch des (3,5-Difluorphenyl)essigsäure-Restes von DAPT durch das entsprechende DiazoDAPT-Motiv führt zum vollständigen Verlust der Aktivität. Außerdem konnte mit der Synthese der Verbindungen **149-151** drei neue potente γ -Sekretase-Inhibitoren hergestellt werden, unabhängig von der Tatsache, ob es sich dabei um kompetitive oder irreversible Strukturtypen handelt.

6 Synthese eines membranundurchlässigen γ -Sekretase-Inhibitors

6.1 Einleitung

Es gilt heute als sicher, dass es sich bei der katalytisch aktiven γ -Sekretase um einen hochmolekularen Proteinkomplex handelt, welcher aus den Untereinheiten PS1 oder PS2, Nicastrin, Aph-1 und PEN-2 besteht.^[88-92] Die Komplexbildung bzw. die Funktion der einzelnen Komponenten sind dagegen noch nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass die jeweiligen Komplexkomponenten sich gegenseitig in ihrer zellulären Expression beeinflussen. Überexprimierte Einzelkomponenten sind nicht stabil (PEN-2, PS) oder maturieren nicht, wie im Falle von Nicastrin.^[94]

Die Bildung des γ -Sekretase-Komplexes beginnt im Endoplasmatischen Retikulum (ER).^[255] Nicastrin und Aph-1 lagern sich zu einer Untereinheit zusammen, wobei das Nicastrin allerdings unentwickelt bleibt. Es folgt die Zusammenlagerung dieses Präkomplexes mit PS und abschließend die Assoziation des PEN-2 zum Trimer, welche die vollständige Reifung des Nicastrin einleitet und die Endoproteolyse des PS induziert.^[256-258] Ob eine Interaktion von PS und PEN-2 vor der Bildung des γ -Sekretase-Komplexes besteht, bleibt unklar. Außerdem ist es momentan noch nicht eindeutig bestätigt, wo im sekretorischen Transportweg die vollständige Bildung des γ -Sekretase-Komplexes stattfindet. In einer Arbeit von Christian Haass et al. weisen alle Ergebnisse darauf hin, dass die einzelnen Bestandteile der γ -Sekretase solange im ER verweilen, wie der Komplex noch nicht voll entwickelt ist. Erst nach einer vollständigen Zusammenlagerung der Komponenten, der Endoproteolyse des PS und der Konformationsänderung des Nicastrins scheint der Komplex das ER zu verlassen und zu seinem eigentlichen Wirkungsort transportiert zu werden.^[259]

Weitere Unklarheiten bestehen vor allem über die Funktionsweise der intramolekularen Substraterkennung und -spaltung der γ -Sekretase. Schwierig ist in diesem Zusammenhang vor allem die Erklärung, wie das für die Proteolyse benötigte Wasser in der hydrophoben Umgebung der Zellmembran zur Verfügung gestellt wird.^[260] Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die Kavität im Selkoe-Modell des aktiven Komplexes.^[261] Verschiedene Theorien wurden vorgeschlagen, so dass über die Lokalisierung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes Uneinigkeit besteht. Die

Identifizierung einer membranundurchlässigen Substanz, welche die γ -Sekretase-Aktivität hemmt, würde gegen eine Lokalisierung des aktiven Komplexes innerhalb der Zelle sprechen und die Vorstellung der intrazellulären APP-Spaltung bekräftigen.

6.2 Syntheseplan

Eine im Wirkstoffdesign der Alzheimerforschung erfolgreich eingesetzte Strategie ist die Einführung eines so genannten *redox chemical delivery systems* (RCDS) in ein Wirkstoffmolekül. Ein potentiell Arzneimittel-molekül wird dabei mit einem lipophilen Dihydropyridincarrier verknüpft, der nach Verabreichung der Substanz dafür sorgen soll, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Im Gehirn angelangt, wird das Dihydropyridin-Motiv enzymatisch zum entsprechenden ionischen Pyridiniumsalz oxidiert. In dieser Form bleibt die Verbindung im Gehirn "gefangen", sie kann nicht über die Blut-Hirn-Schranke zurück.^[113,114] Die effektive Konzentration der entsprechenden Substanz wird auf diese Weise am Wirkungsort erhöht, weshalb kleine Dosierungsmengen oft als ausreichend erscheinen. Mögliche Nebenwirkungen werden somit reduziert. Außerdem wird die Substanz, die den Weg über die Blut-Hirn-Schranke nicht gefunden hat, viel schneller von Leber und Niere abgebaut.

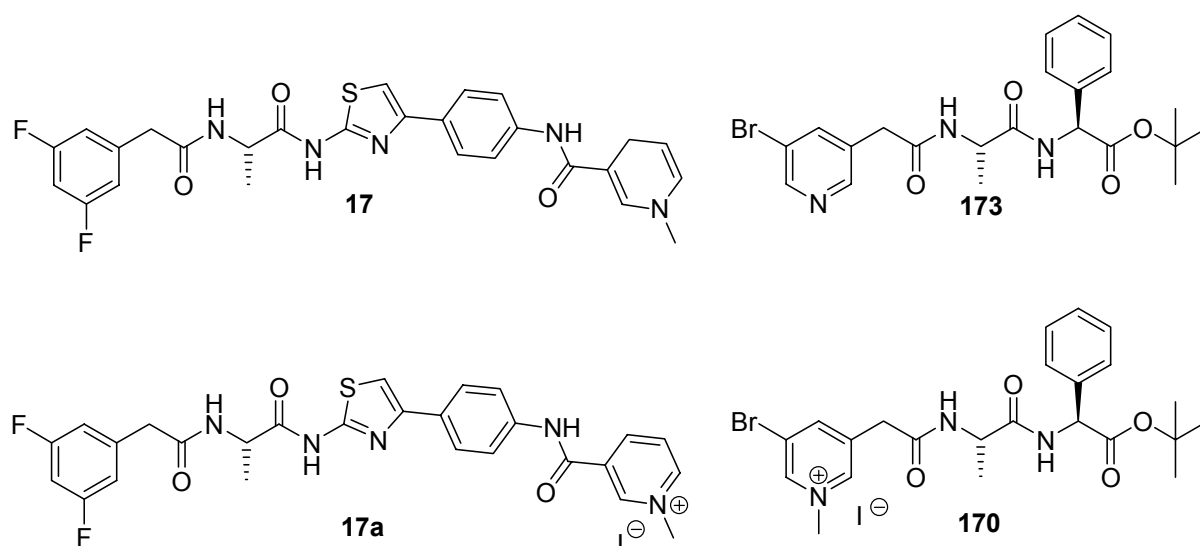
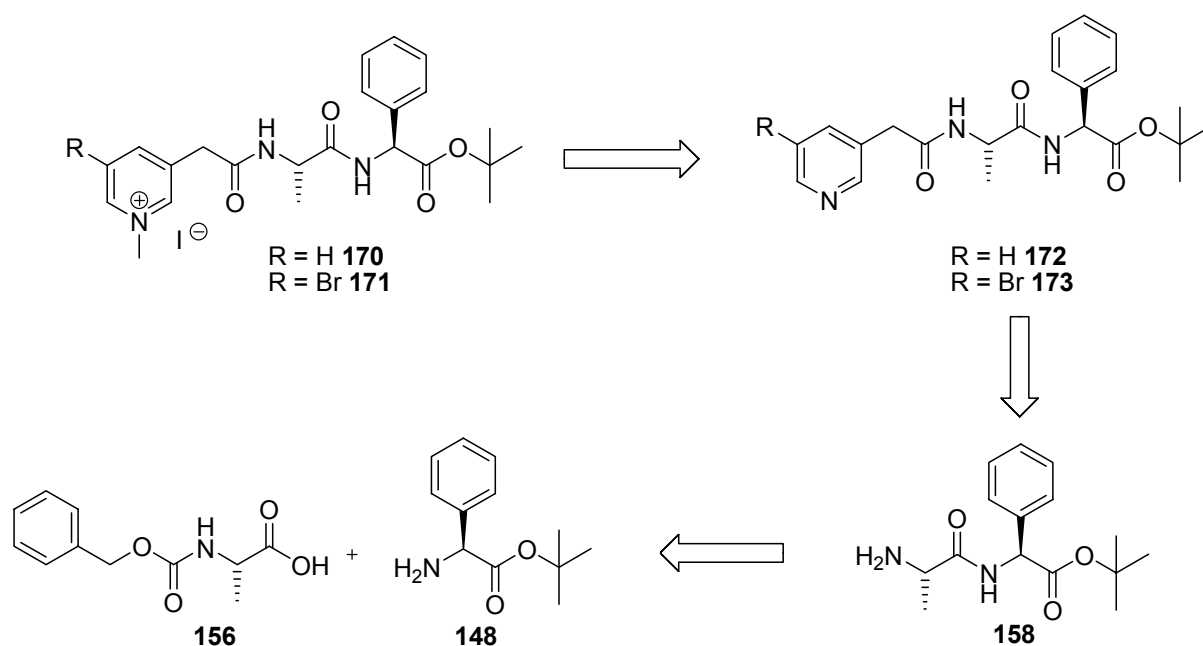


Abbildung 6.1. Strukturen der γ -Sekretase-Inhibitoren **17** und **173**. Verbindung **17** ist mit einer RCDS-Gruppe verknüpft und besitzt ein verbessertes pharmakologisches Profil. **17a**: ionisches Äquivalent der Verbindung **17**. **170**: potentieller membranundurchlässiger γ -Sekretase-Inhibitor.

In einer Arbeit von Jean-Louis Kraus et al. konnte gezeigt werden, dass das ionische Äquivalent (**17a**) des Thiazolamides **17** (Abb. 6.1) nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^[115] Zudem ist aus eigenen früheren Arbeiten bekannt, dass die aus DAPT-Fragmenten zusammengesetzte Verbindung **173** die γ -Sekretase-Aktivität hemmt (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Identifizierung der methylierten Pyridinderivate **170** und **171** (Abb. 6.1) als membranundurchlässige γ -Sekretase-Inhibitoren erscheint deshalb vielversprechend.

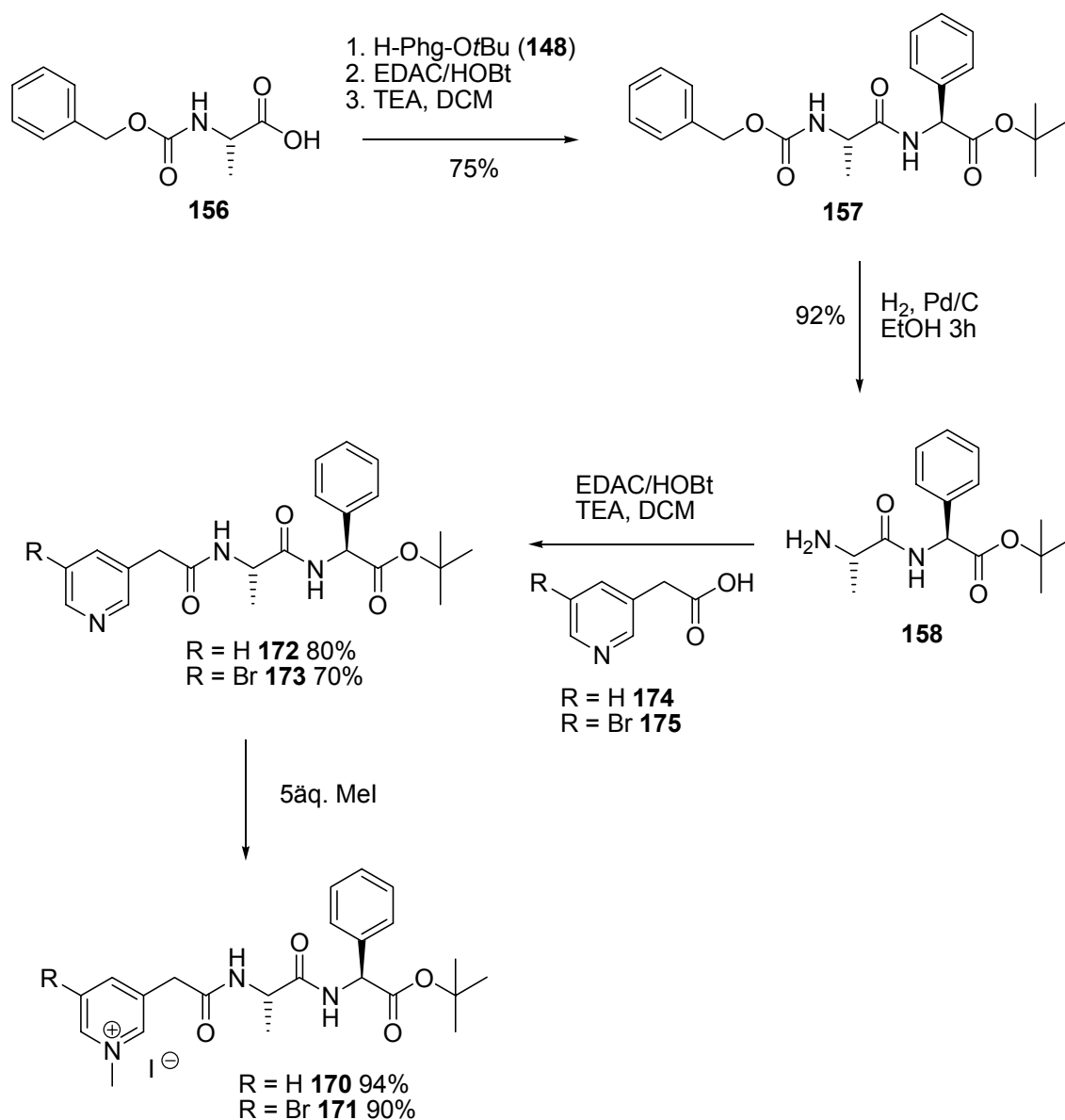
In Schema 6.1 ist eine mögliche Retrosynthese der gewünschten Verbindungen **170** und **171** abgebildet. Das DAPT-Grundgerüst lässt sich, wie schon in Kapitel 5 beschrieben, aus den Startmaterialien **156** und **148** über etablierte Peptidkupplungs- und Entschützungsreaktionen aufbauen. Die Alkylierung des Pyridins der Verbindungen **172** und **173** sollte unter Verwendung von Methyljodid möglich sein.



Schema 6.1. Retrosynthese der potentiellen membranundurchlässigen γ -Sekretase-Inhibitoren **170** und **171**.

6.3 Synthese

Die Synthese der γ -Sekretase-Inhibitoren **170** und **171** ist im Schema 6.2 dargestellt. Z-Gly-OH **156** wird über EDAC/HOBt-Bedingungen mit dem Hydrochlorid von H-Phg-OtBu verknüpft. Die Schutzgruppe wird reduktiv entfernt und die entstandene Verbindung **158** mit den beiden Essigsäure-Derivaten **174** und **175** wiederum unter Verwendung der EDAC/HOBt-Methode in guten Ausbeuten gekuppelt. Die beiden Dipeptide **172** und **173** werden abschließend unter Verwendung von 5 Äq. MeI ohne Lösungsmittel zu den Verbindungen **170** und **171** in sehr guten Ausbeuten umgesetzt.



Schema 6.2. Synthese der γ -Sekretase-Inhibitoren **170** und **171**.

6.4 Biologische Aktivität & Ausblick

Die γ -Sekretase-Aktivität der Verbindungen **170** und **171** wurde mittels *de novo* Produktion von AICD *in vitro* im rekonstituierten, zellfreien Assay (aus HeK293 Zellen), sowie der A β -Bildung im zellulären Assay (H4) verfolgt (siehe Kapitel 5.4). Bis zu einer Konzentration von 100 μ M konnte dabei für Substanz **170** keinerlei AICD-Hemmung festgestellt werden. Dagegen zeigt **171** eine Inhibition von AICD im mikromolaren Bereich. Einziger Unterschied in der Struktur von **171** ist ein zusätzlicher Bromsubstituent in Position fünf des Pyridinrings. Beide Substanzen sind sehr eng an die Struktur von DAPT (**13**) gehalten, umso erstaunlicher erscheint es, dass **170** gänzlich seine Aktivität verliert. Ähnliche Aktivitätssteigerungen werden jedoch bei der Einführung der beiden Fluorsubstituenten in DAPT beobachtet.

Im zellulären Assay hat Verbindung **171** ($IC_{50} = 2.5 \mu$ M) eine vergleichbare Aktivität wie Substanz **17a** ($IC_{50} = 1.0 \mu$ M), dem ionischen Äquivalent von Molekül **17**.^[115] Es konnte gezeigt werden, dass diese ionische Verbindung (**17a**) nicht in der Lage ist, die hydrophobe Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^[115] Gleiches könnte auch für Substanz **171** gültig sein, muss allerdings durch weitere biologische Tests eindeutig charakterisiert werden. Mit dem Postulat (und dem Vorbehalt) der Membranundurchlässigkeit bestätigt dieses Ergebnis die Lokalisation des aktiven γ -Sekretase-Komplexes an der Zelloberfläche.

In weiterführenden Studien sollte das pharmakologische Profil von Verbindung **171** untersucht werden. Hierfür ist es nötig, die Substanz zum entsprechenden Dihydropyridin (**176**) zu reduzieren (Abb. 6.2). Wenn diese Verbindung die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zum aktiven Inhibitor metabolisiert wird, kann letztendlich überprüft werden, ob die DAPT-assoziierten Nebenwirkungen am Haarfolikel und im Gastrointestinaltrakt durch Anwendung dieses RCDS-Prinzips reduziert werden können.

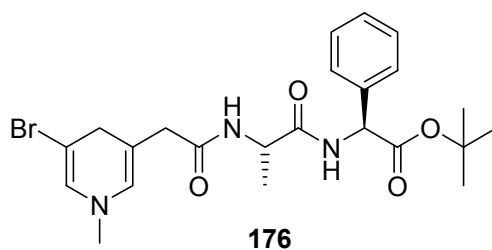


Abbildung 6.2. Dihydropyridin-Verbindung **176**.

7 Potential von GSK3-Inhibitoren in der Therapie von Morbus Alzheimer

7.1 Einleitung

Eine der am häufigsten auftretenden post-translationalen Veränderungen von Proteinen ist die Phosphorylierung. Viele Prozesse werden auf diesem Weg in Zellen reguliert. Abnormalitäten in diesen Mechanismen stehen allerdings in direktem Zusammenhang mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten. Die Kontrolle der für die Phosphorylierung notwendigen Kinasen oder Phosphatasen ist demnach von großem Interesse in der gegenwärtigen Wirkstoffentwicklung.^[262,263]

Die Alzheimersche Krankheit wird von zwei Hauptmerkmalen gekennzeichnet: den Amyloiden Plaques und den Neurofibrillären Bündeln. Ein ideales Therapeutikum müsste demnach die Entstehung beider abnormalen Proteine verhindern. Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben wurde, steht die Glykogen Synthase Kinase 3 mit beiden Prozessen, die zu diesen Ablagerungen führen, in Verbindung.

In einer 2003 erschienenen Arbeit wurde darüber berichtet, dass Lithium neben der bereits bekannten Hemmung der Phosphorylierung von Tau ebenso in der Lage sein soll, die Produktion von A β zu reduzieren.^[264] Die Inhibition von GSK3 scheint also beide pathogenen Prozesse von Morbus Alzheimer zu verhindern. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt allerdings, dass nicht-toxische Konzentrationen von Lithium in zwei verschiedenen *in vitro* Testsystemen dagegen die A β -Produktion erhöht, indem die β -Sekretase-Aktivität verstärkt wird.^[265] Eine Verwendung von Lithium als Alzheimertherapeutikum scheint somit ausgeschlossen.

Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse bleibt die Inhibition von GSK3 weiterhin eine vielversprechende Möglichkeit beide pathogenen Prozesse der AD zu verhindern. Untersuchungen von alternativen GSK3-Antagonisten sollen neue Erkenntnisse über das Potential in der Alzheimertherapie liefern.

7.2 Allgemeine Überlegungen, Syntheseplan

Zahlreiche Verbindungen konnten bislang als potente GSK3-Inhibitoren identifiziert werden.^[266] Viele dieser Substanzklassen besitzen eine hohe Aktivität, wirken allerdings genauso als Antagonisten gegenüber GSK3 strukturverwandten Enzymen. Für Substanz AR-A014418 (**177**), welche von AstraZeneca entwickelt wurde, scheint dies nicht zu gelten. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung zwar GSK3 β im nanomolaren Bereich inhibiert, allerdings keinerlei Einfluss auf die Aktivität anderer Kinasen ausübt.^[267] Neben der hohen Aktivität trägt gerade diese Eigenschaft dazu bei, dass das Grundgerüst von Substanz **177** besonders geeignet erscheint, um das Potential von GSK3-Inhibitoren für die Alzheimertherapie weiter zu untersuchen.

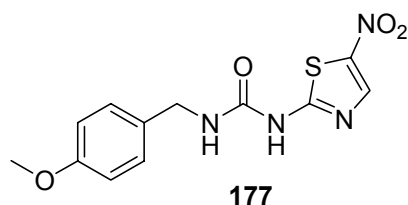
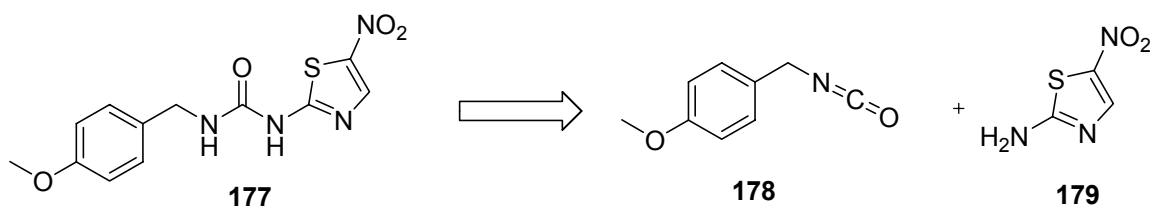


Abbildung 7.1. Struktur der Substanz AR-A014418 (**177**).

Bei Verbindung **177** handelt es sich um ein Harnstoffderivat (Abb. 7.1), welches durch nukleophile Substitution eines entsprechenden 5-Nitrothiazol-2-amins mit 4-Methoxybenzylisocyanat hergestellt werden kann (Schema 7.1).



Schema 7.1. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **177**.

Durch Variation der Bausteine **178** und **179** können auf einfache Weise verschiedene Derivate des Strukturtyps hergestellt werden, deren Einfluss auf die A β -Bildung und die Tau-Aggregation untersucht werden können.

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Synthese wird anstelle des *p*-Methoxybenzylisocyanates ein entsprechendes *p*-Fluor-Derivat verwendet. Dies

hat den einfachen Grund, dass durch diesen Austausch die Lipophilie der Verbindungen erhöht wird, was wiederum die Möglichkeit zum Passieren der Blut-Hirn-Schranke verbessert. In Anlehnung an die Grundstruktur von **177** werden verschiedene heterocyklische aromatische Amine als Reaktionspartner bevorzugt.

7.3 Synthese

In einer 1. Generation konnten die Verbindungen **180-191** hergestellt werden (Abb. 7.2). Eine beispielhafte Synthese ist in Schema 7.2 dargestellt.

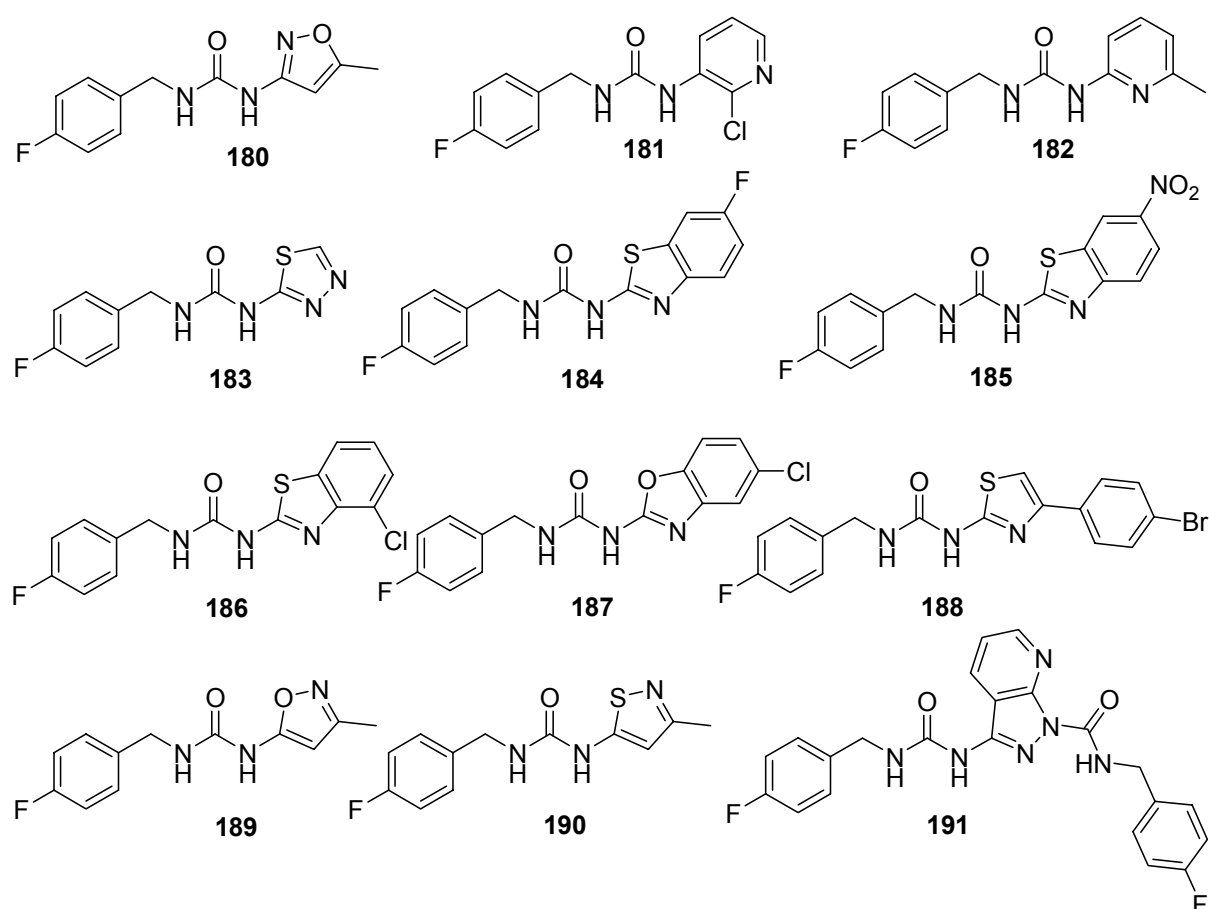
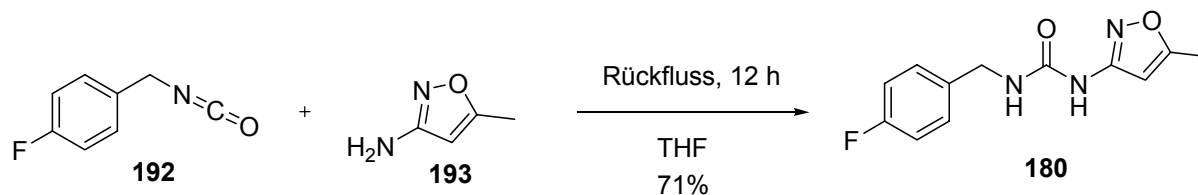


Abbildung 7.2. Strukturen der Verbindungen aus der 1. Generation **180-191**.

p-Fluorbenzylisocyanat wird in THF für ca. 12 h unter Rückfluss mit 1.1 Äq. (2.1 Äq. bei der Synthese von Substanz **191**) von Verbindung **193** gerührt. Das Rohprodukt wird mit wässriger HCl gewaschen, um überschüssiges Startmaterial zu entfernen. Zur weiteren Aufreinigung ist lediglich eine Umkristallisation in Methanol respektive

Ethanol nötig, so dass die Substanzen **180-191** in moderaten bis guten Ausbeuten erhalten werden konnten (Schema 7.2).



Schema 7.2. Synthese von Verbindung **180**.

Durch Auswertung der biologischen Tests konnte festgestellt werden, dass Verbindung **188** die A β -Bildung hemmt. Weitere Verbindungen des gleichen Typs sollten deshalb in einer 2. Generation hergestellt werden, um Kenntnisse über die Struktur-Aktivitätsbeziehung zu gewinnen.

Zur Synthese der Verbindungen der 2. Generation (Abb. 7.4) mussten zunächst die Substanzen **194-197** hergestellt werden, die als Startmaterialien verwendet werden sollten (Abb. 7.3).

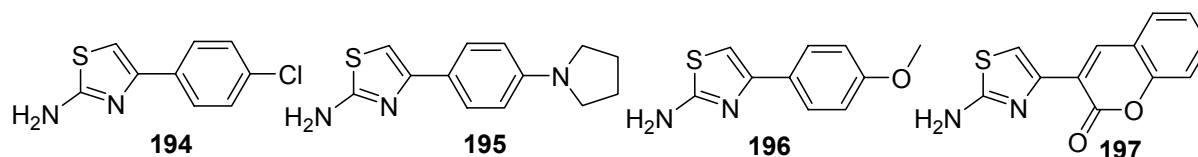
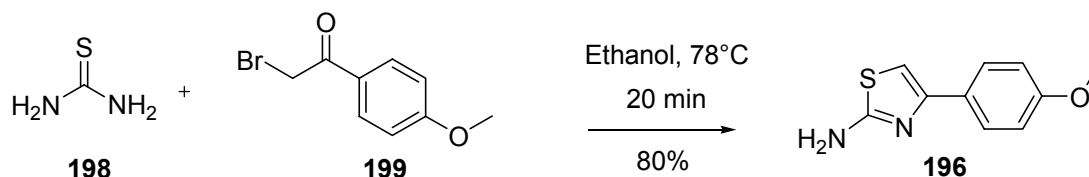


Abbildung 7.3. Strukturen der Verbindungen **194-197**.

Ein Reaktionsbeispiel ist in Schema 7.3 dargestellt. Thioharnstoff wird mit einem Bromacetophenon-Derivat (**199**) in Ethanol erhitzt. Die Thiazolverbindungen konnten nach wässriger Aufarbeitung ohne weitere Aufreinigung in guten Ausbeuten gewonnen werden.



Schema 7.3. Synthese von Verbindung **196**.

Die Thiazolderivate **194-197** konnten anschließend mit *p*-Fluorbenzylisocyanat nach dem bereits beschriebenen Schema (Schema 7.2) zur Synthese der Verbindungen **200-203** eingesetzt werden.

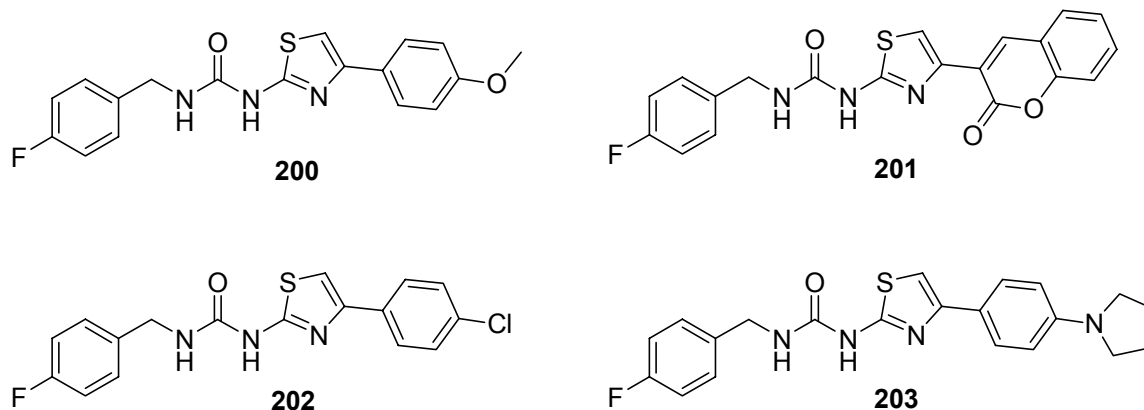


Abbildung 7.4. Strukturen der Verbindungen aus der 2. Generation **200-203**.

7.4 Biologische Aktivität

Wie bereits beschrieben sind die synthetisierten Verbindungen **180-191** und **200-203** alle von dem potentem GSK3 β -Inhibitor AR-A014418 (**177**) abgeleitet. Um das Potential dieser Substanzen für die Alzheimertherapie beurteilen zu können, wurden sie auf ihre Eigenschaften untersucht, die A β -Bildung zu hemmen und die Tau-Phosphorylierung zu verhindern.

Die Aktivitätsbestimmungen wurden in Kooperation mit Dr. Sascha Weggen von der Johannes Gutenberg Universität in Mainz und der Gruppe um Prof. Fred van Leuven von der Flanders Interuniversity for Biotechnology in Leuven (Belgien) durchgeführt.

7.4.1 Einfluss auf die A β -Aktivität

Anhand eines zellulären Assays unter Verwendung von CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*), welche APP₇₅₁ und PS1-M146L stabil überexprimieren, konnte der Einfluss der hergestellten Verbindungen auf die A β -Hemmung verfolgt werden.^[268] Als Nachweis für die A β -Aktivität wurde ein *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) - ein immunologisches Nachweisverfahren - durchgeführt. In Abb. 7.5 ist die graphische Auswertung dieser Untersuchung zu sehen. Die Gesamtmenge von A β wurde bei zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen prozentual mit einer DMSO-Kontrolle verglichen.

Außerdem dienen der GSK3 β -Inhibitor AR-A014418 (**177**) von AstraZeneca und der γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 (**12**) als Referenzsubstanzen.

Verbindung **188** zeigt als einzige Substanz eine signifikante Reduzierung des A β -Levels. Die Aktivität des GSK3 β -Inhibitors AR-A014418 (**177**) ist allerdings bedeutend höher. Auffällig ist außerdem, dass bei einer Reihe von Substanzen die A β -Konzentration größer ist als bei der DMSO-Kontrolle. Über die Ursache dieses Effektes kann nur spekuliert werden.

Die Analyse der biologischen Untersuchung der Substanzen aus der 2. Generation (Abb. 7.6) zeigt, dass alle weiteren Derivate von Verbindung **188** ebenfalls die A β -Bildung reduzieren. Dabei scheint allerdings bei keiner der Substanzen die Aktivität höher zu liegen als die von Molekül **188**.

Um genauere Aussagen darüber machen zu können, welche Sekretase durch Verbindung **188** gehemmt wird, müssen weitere Tests folgen, in denen zwischen A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ differenziert wird.

A β -Gehalt [%]

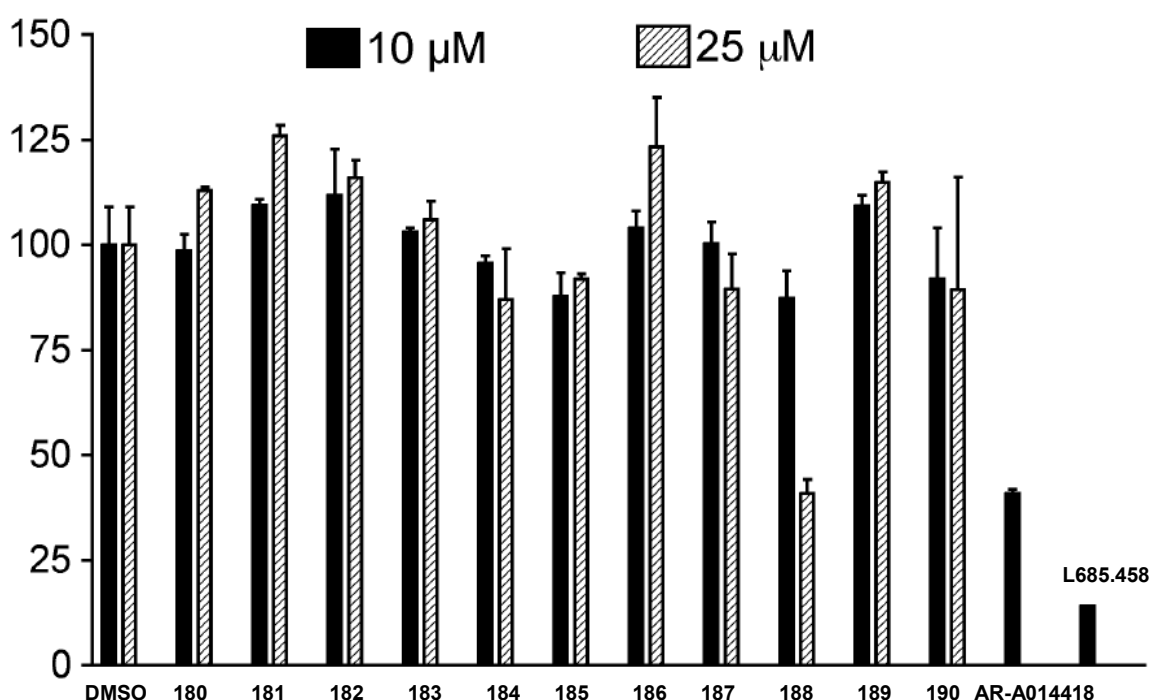


Abbildung 7.5. Graphische Auswertung der A β -Hemmung der Verbindungen **180-190**. Zellulärer Assay von CHO-Zellen, welche APP₇₅₁ und PS1-M146L überexprimieren. Die Gesamtmenge an A β wird bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (10 μ M und 25 μ M) prozentual mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Als Referenzsubstanzen dienen der AstraZeneca-Inhibitor AR-A014418 und der γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 (Konzentration: 2.5 μ M).

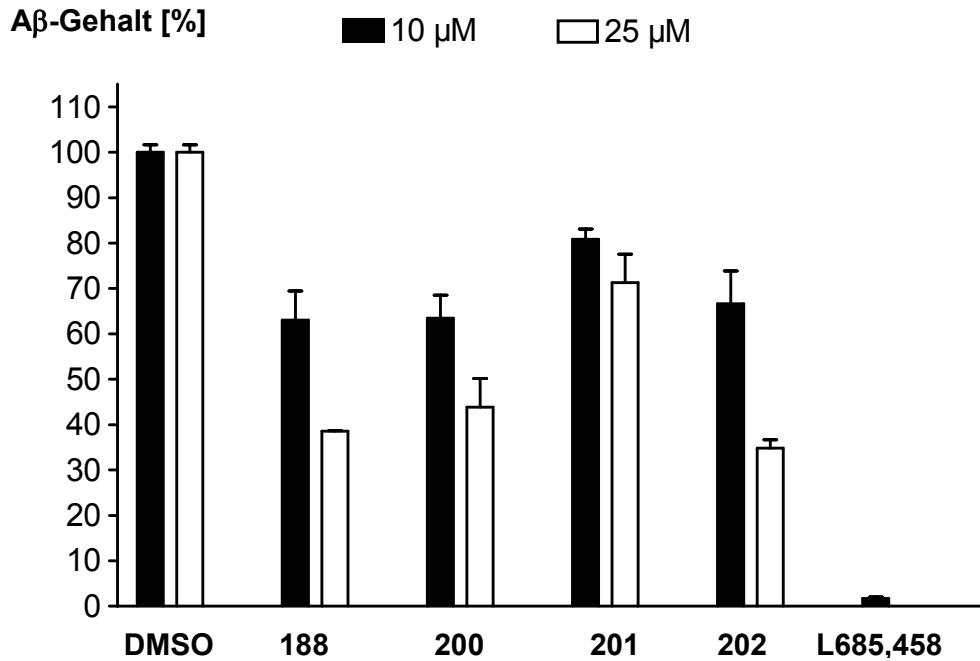


Abbildung 7.6. Graphische Auswertung der Aβ-Hemmung der Verbindungen **188 & 200-202**. Zellulärer Assay von CHO-Zellen, welche APP₇₅₁ und PS1-M146L überexprimieren. Die Gesamtmenge an Aβ wird bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (10 μM und 25 μM) prozentual mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Als Referenzsubstanzen dient der γ-Sekretase-Inhibitor L-685,458 (Konzentration: 2.5 μM).

7.4.2 Einfluss auf die Tau-Phosphorylierung

Mit der Durchführung von zwei verschiedenen zellulären Assays sollen die Einflüsse der Verbindungen **180-191** auf die Tau-Phosphorylierung analysiert werden. Zur Identifizierung der jeweiligen Western Blots kommen drei verschiedene Antikörper zum Einsatz. Der Tau5-Antikörper erkennt alle Formen von Tau, unabhängig vom Grad der Phosphorylierung. Die Antikörper AD2 und AT100 identifizieren dagegen nur spezifisch phosphorylierte Formen von Tau (AD2: Phosphorylierung an Ser₃₉₆ und Ser₄₀₄; AT100 Phosphorylierung an Thr₂₁₂ und Ser₂₁₄).

7.4.2.1 N2a-Tau4R-EGFP-Zellassay

Das N2a-Tau4R-EGFP-Zellassay basiert auf der Untersuchung von Neuroblasten. Dieses sind junge, nicht endgültig differenzierte Nervenzellen, die sich teilen bzw. Funktionsproteine synthetisieren. Der Einfluss der Verbindungen **180-191** auf die Phosphorylierung von Tau wurde in drei verschiedenen Substanzkonzentrationen bestimmt (10 nM, 1 μM, 100 μM) (Abb. 7.7). Die Aktivität wird als Quotient von AD2

zu Tau5 im Vergleich zu DMSO angegeben. Je geringer der Prozentsatz ist, desto besser wurde die Phosphorylierung an Ser₃₉₆ und Ser₄₀₄ unterbunden.

Substanz **182** zeigt die beste Hemmung der Tau-Phosphorylierung (10 nM). Bei einer Konzentration von 100 µM tritt allerdings der Zelltod ein. Die Verbindungen **180** und **181** haben ebenso eine erhebliche Wirkung auf die Phosphorylierung (10 nM). Erstaunlicherweise verschlechtert sich jedoch die Hemmung mit höheren Substanzkonzentrationen. Nur einen geringen Einfluss nimmt Verbindung **188**. Der gewünschte Effekt, eine Substanz herzustellen, die sowohl die Tau-Phosphorylierung hemmt als auch die Aβ-Bildung verhindert, scheint nicht gelungen zu sein.

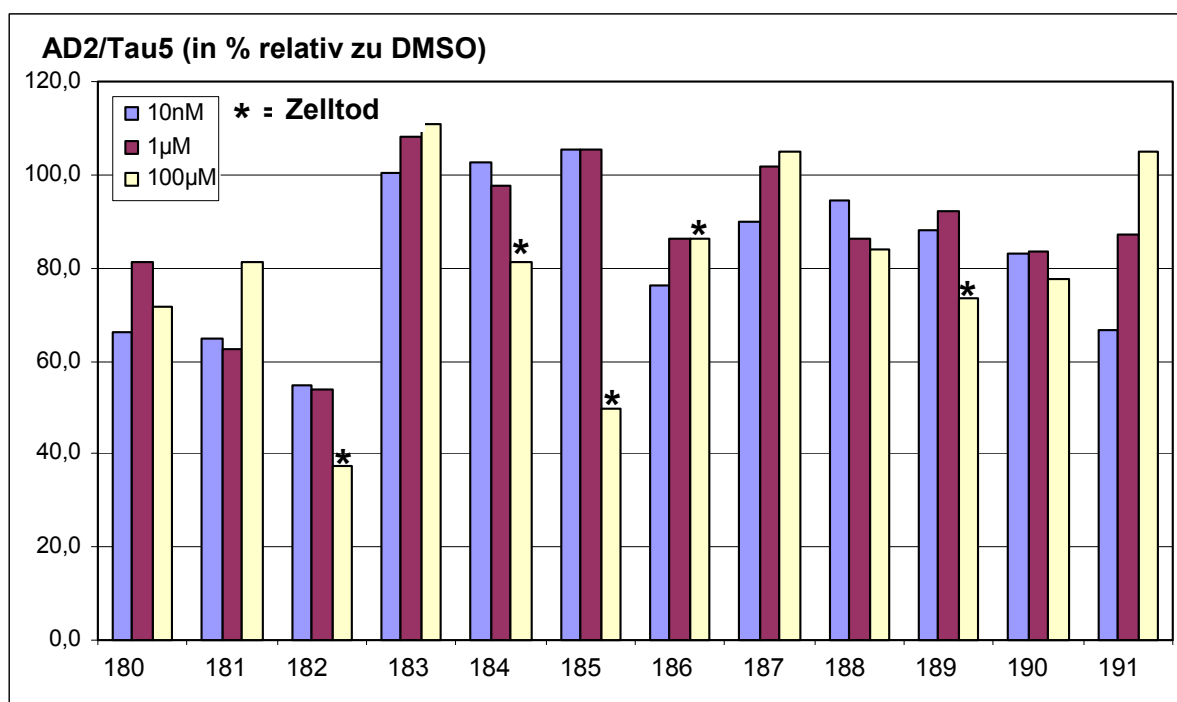


Abbildung 7.7. Graphische Auswertung des N2a-Tau4R-EGFP-Zellassays. Der Einfluss der Verbindungen **180-191** auf die Phosphorylierung von Tau wurde in drei verschiedenen Substanzkonzentrationen bestimmt (10 nM, 1 µM, 100 µM). Die Aktivität wird als Quotient von AD2 zu Tau5 im Vergleich zu DMSO angegeben. Ein Sternchen markiert die Substanzkonzentrationen, bei denen nach Inkubation von 48 h der Zelltod eingetreten ist.

7.4.2.2 Hefe-Zellassay

Hefezellen, die humanes Tau exprimieren, können als Modell für die Tau-Hyperphosphorylierung eingesetzt werden.^[269] Die Hefeenzyme Mds1 und Pho85 übernehmen dabei vergleichbare Funktionen wie die humanen Enzyme GSK3β und CDK5. Die synthetisierten Verbindungen **180-191** wurden in nicht-toxischen Konzentrationen von 100 µM anhand eines solchen zellulären Assays analysiert (Abb. 7.8). Mittels Western Blotting wurden die Phosphoepitope AD2 und AT100

sowie der Tau-Gesamtgehalt identifiziert. Eine Senkung der Enzymaktivität zeigt sich in der Abnahme der Phosphoepitope.

Bei den Verbindungen **180** und **181** konnte eine deutliche Hemmung der Tau-Phosphorylierung festgestellt werden. Die Substanzen **183** und **190** weisen einen geringeren AD2/Tau-Quotienten auf. Eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung tritt dagegen vor allem bei **187** auf.

Der Effekt auf die Tau-Aktivität des Hefezellen-Assays ist teilweise nicht identisch mit den Ergebnissen aus den N2a-Tau4R-EGFP-Versuchen. Substanz **182** beispielsweise zeigt die beste Hemmwirkung in den N2a-Zellen. In den Hefezellen dagegen konnte nur eine leichte Abnahme des AD2-Gehaltes registriert werden.

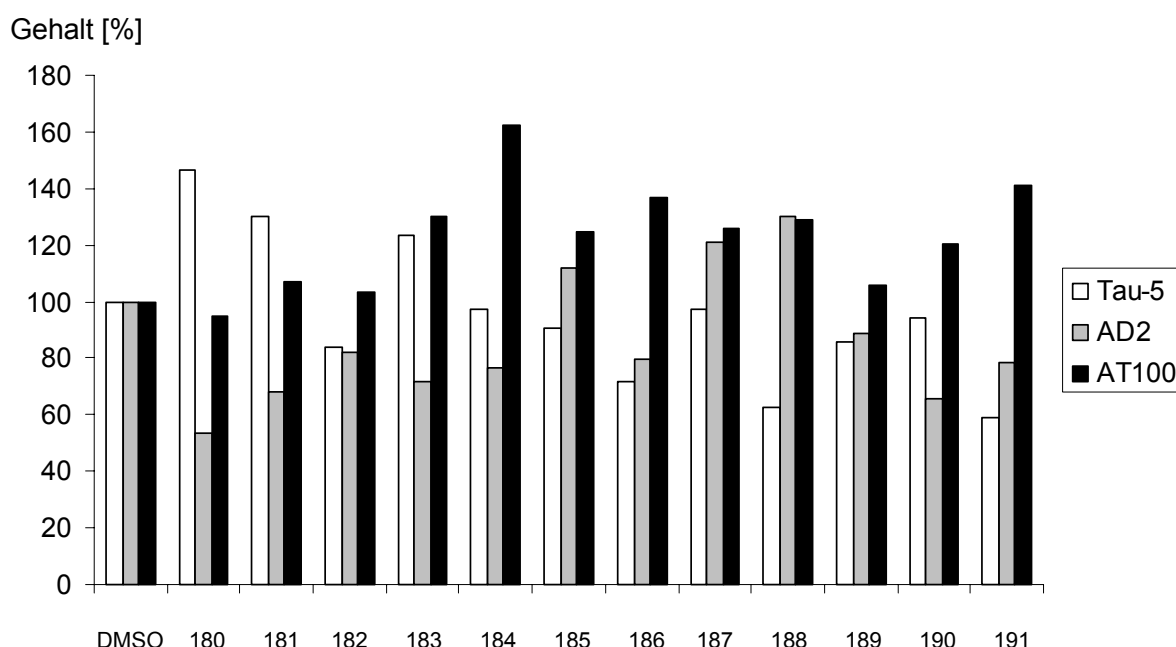


Abbildung 7.8. Graphische Auswertung des Hefezellen-Assays. Substanzkonzentration: 100 μ M. Mittels Western Blotting wurden die Phosphoepitope AD2 und AT100 sowie der Taugesamtgehalt identifiziert. Eine Senkung der Enzymaktivität zeigt sich in der Abnahme der Phosphoepitope im Vergleich zu einer DMSO-Lösung.

7.5 Zusammenfassung & Ausblick

Keine der synthetisierten Verbindungen **180-191** ist in der Lage, die A β -Bildung zu verringern und gleichzeitig die Tau-Phosphorylierung zu unterdrücken.

Die zur Identifizierung der Tau-Aktivität eingesetzten Assays zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Zusammenfassend kann allerdings gesagt werden, dass die Substanzen

180-182 die höchsten Aktivitäten aufweisen, was durch die enge Verwandtschaft zu dem GSK3 β -Inhibitor AR-A014418 (**177**) allerdings nicht verwunderlich erscheint.

Die Erklärung, warum Verbindung **188** allerdings die A β -Bildung verringert, fällt etwas schwieriger aus. Von Interesse ist es, ob die A β -Reduktion in Folge einer Beeinflussung der β - oder der γ -Sekretase-Aktivität zu Stande kommt.

In einem *in silico* Screening konnten kürzlich Harnstoffderivate wie Verbindung **204** (Abb. 7.9) als kompetitive BACE-Inhibitoren identifiziert werden.^[270] Die Vermutung liegt nahe, dass Substanz **188** auf ähnliche Weise Einfluss auf die A β -Verringerung nimmt. Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass ein Mechanismus als BACE-Inhibitor auszuschließen ist, da sowohl Verbindung **188** als auch die Derivate **200-202** keinerlei Aktivität in einem BACE-FRET Assay zeigen.^[72]

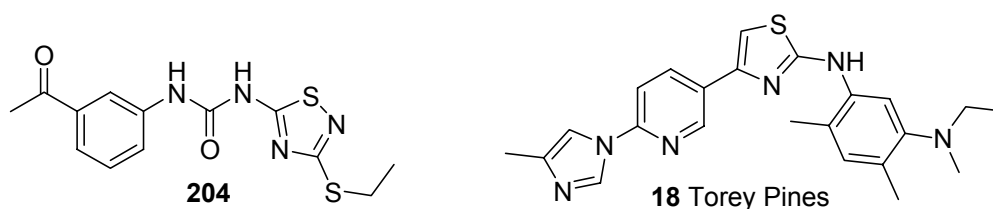


Abbildung 7.9. BACE-Inhibitor **204** und der „Torrey Pines“ γ -Sekretase Modulator **18**.

Nachdem ein Einfluss auf die β -Sekretase ausgeschlossen werden kann, scheint eine Beeinträchtigung der γ -Sekretase-Aktivität als einzige Möglichkeit denkbar. Diese Vermutung muss mit weiteren biologischen Tests belegt werden.

Vergleicht man Verbindung **188** mit dem γ -Sekretase-Modulator **18** (Abb. 7.9) so scheint es durchaus denkbar, dass beiden Substanzen ein gleicher Inhibitions-Mechanismus zu Grunde liegt.

Die Beeinträchtigung der GSK3-Aktivität bietet eine interessante Möglichkeit zur medikamentösen Behandlung der Alzheimerschen Krankheit. Sie nimmt wahrscheinlich eine Schlüsselposition in der Entstehung der Erkrankung ein, da sie als Verknüpfungspunkt zwischen der A β -Pathologie und der Tau-Hypothese angesehen werden kann. Die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen konnten keine gleichzeitige Hemmung auf beide Kennzeichen von Morbus Alzheimer ausüben. Trotzdem bleibt es weiterhin von Interesse die Möglichkeit einer beidseitigen Beeinflussung von A β und Tau zu untersuchen.

Mit Verbindung **188** scheint dagegen die Synthese eines γ -Sekretase-Modulators gelungen zu sein. Weitere Verbindungen müssen hergestellt werden, um genauere Aussagen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen machen zu können. Ideal scheint hierfür zunächst den Bromsubstituenten auszutauschen, wie es schon bei Verbindung **200-203** geschehen ist.

8 Ligandenbasiertes virtuelles Screening: Suche nach neuen Leitstrukturen für die Inhibition der Tau-Aggregation

8.1 Einleitung

„A model must be wrong, in some respects, else it would be the thing itself. The trick is to see where it is right.“ (Henry A. Bent)

Die Aggregation des Tau-Proteins in *paired helical filaments* (PHFs) ist eine der Hauptkennzeichen von Morbus Alzheimer. Verbindungen, welche die Zusammenlagerung verhindern bzw. bereits vorhandene Filamente auflösen, sind deshalb von großem Interesse in der Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten zur Bekämpfung der Alzheimererkrankung.

Pickhardt et al. berichteten von einem Hochdurchsatz-Screening mit dem sie in der Lage waren, zahlreiche Verbindungen als Tau-Aggregations-Inhibitoren zu identifizieren.^[144] Da Tau ein außergewöhnlich lösliches Protein mit nur relativ geringer Sekundärstruktur ist, fehlt bis heute eine erfolgreiche dreidimensionale Strukturaufklärung. Die Wirkungsweise dieser Verbindungen bleibt somit unklar.

Eine Möglichkeit die Struktur-Aktivitätsbeziehungen in eine dreidimensionale Information umzuwandeln, ist die Bildung eines pharmakophoren Modells. Ein Pharmakophor ist die Zusammensetzung von sterischen und elektronischen Eigenschaften, die für eine optimale Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor notwendig ist, um dessen biologische Aufgabe auszuschalten bzw. auszulösen.^[271]

Ein Pharmakophor beschreibt dabei keineswegs ein reales Molekül oder eine reale Assoziation von funktionellen Gruppen, es repräsentiert vielmehr ein vereinfachtes Konzept von notwendigen Interaktionseigenschaften einer Gruppe von Verbindungen zu einer bestimmten Zielstruktur. Es beschreibt den kleinsten gemeinsamen Nenner verschiedener aktiver Moleküle und wird oft auch als Pseudo-Rezeptor-Modell bezeichnet.^[272]

Mit Hilfe eines pharmakophoren Modells können Datenbanken virtuell untersucht werden. Trotz der Kenntnis zahlreicher aktiver Verbindungen für ein bestimmtes

target, bleibt es oft wünschenswert, neue Leitstrukturen mit besserem pharmakologischem Profil zu finden. Man nennt diesen Prozess auch *scaffold hopping*. Es bezeichnet die Identifizierung von aktiven isofunktionalen Verbindungen mit verschiedener Grundstruktur.

CATALYST[®] von der Firma Accelrys Inc. ist eine *Molecular Modeling* Software, die speziell für ligandenbasiertes Design von neuen Leitstrukturen entwickelt wurde.

Die aus der Arbeit von Pickhardt et al. erhaltenen Struktur-Aktivitätsbeziehungen konnten unter Verwendung von CATALYST[®] genutzt werden, um verschiedene pharmakophore Modelle zu erzeugen. Diese wiederum wurden für ein virtuelles Screening einer 59676 Moleküle umfassenden Datenbank (Maybridge “*Screening collection*” database (Oktober 2004)) eingesetzt. Als Resultat konnte eine Liste mit 136 Substanzen erhalten werden, von denen 19 Verbindungen ausgesucht und auf ihre Aktivität als Tau-Aggregations-Inhibitor untersucht wurden.

8.2 Erzeugung der pharmakophoren Modelle und virtuelles Screening mit CATALYST[®]

Ligandenbasiertes virtuelles Screening hat sich in den letzten Jahren als nützliche Methode zur Identifizierung neuer Leitstrukturen bewährt.^[273] Zusammen mit anderen so genannten computergestützten *de novo* Design-Methoden ist es ein nützliches Werkzeug zur Unterstützung und Ergänzung von HTS-Konzepten.^[272]

Eine besondere Herausforderung bei der Suche nach neuen Leitstrukturen in der Wirkstoffentwicklung ist die Bildung eines pharmakophoren Modells. Besonders schwierig wird es gerade dann, wenn keinerlei dreidimensionale Information des entsprechenden *targets* vorhanden ist. Das Programm CATALYST[®] wurde speziell für solche Problemstellungen entwickelt. Es transferiert Datensätze von aktiven und inaktiven Verbindungen in dreidimensionale pharmakophore Modelle, die innerhalb der Software Hypothesen genannt werden.

In CATALYST[®] stehen verschiedene Möglichkeiten zur Generierung einer Hypothese zur Auswahl. Der Algorithmus HipHop basiert auf der Identifizierung und Anordnung üblicher Muster von Funktionalitäten und Eigenschaften verschiedener aktiver Verbindungen einer Serie, ohne dabei die IC₅₀-Werte zu berücksichtigen. Alternativ bietet CATALYST[®] die Möglichkeit zu einer vollautomatisierten Generierung

pharmakophorer Modelle. Mit dem HypoGen-Algorithmus werden unter Berücksichtigung und Gewichtung der einzelnen Aktivitäten von Verbindungen aus einem *training set* die chemischen Eigenschaften dieser Substanzen automatisch in eine Hypothese umgewandelt. Das resultierende Modell ist sehr stark mit den Ausgangsdaten verknüpft, weshalb die Auswahl eines solchen *training sets* von enormer Wichtigkeit ist.^[274] Große Bedeutung hat vor allem die Qualität der biologischen Daten. Die verwendeten IC₅₀-Werte sollten zur Vergleichbarkeit alle aus dem gleichen Assay entnommen werden. Ein *training set* sollte zudem mindestens 18 Substanzen umfassen, wobei die Aktivitäten sich in 4 Größenordnungen unterscheiden sollten. Jede Größenordnung ist dabei am besten mit drei Molekülen vertreten, die alle eine größtmögliche Strukturvielfalt besitzen sollten. Neben der Struktur der potentesten Substanz sollten auch genauso weniger aktive Verbindungen in die Liste aufgenommen werden. Ein solches „ideales“ *training set* steht allerdings nur in Ausnahmefällen am Beginn eines Projektes zur Verfügung. Man sollte jedoch versuchen diese Kriterien soweit wie möglich umzusetzen.^[275]

Das *training set* des vorliegenden Projektes wurde aus 21 Verbindungen zusammengesetzt (Abb. 8.1 und 8.2). Die zugrunde liegenden Daten wurden uns von der Gruppe um Eckardt Mandelkow des Max-Planck-Instituts Hamburg überlassen. Nach Absprache können daher die jeweiligen Aktivitäten der Substanzen **205-225** nicht genannt werden und fehlen in den Abbildungen.

Mittels Hochdurchsatz-Screening waren Pickhardt et al. in der Lage aus einer Substanzbibliothek von 200.000 Verbindungen 1266 Substanzen mit Aktivität als Tau-Aggregations-Inhibitor zu identifizieren; 77 dieser Verbindungen können außerdem in niedriger mikromolarer Konzentration bereits bestehende Tau-Aggregate auflösen.^[144] Die Substanzen für das vorliegende *training set* wurden aus diesen 77 Verbindungen ausgesucht. Die IC₅₀-Werte der Hemmung der Tau-Aggregation variieren dabei über drei Größenordnungen bis zu einem Wert von 25 µM. Obgleich damit nicht das ideale Kriterium einer Variation über 4 Größenordnungen eingehalten werden konnte, erschien es uns als ausreichend für die Durchführung des vorliegenden Projektes.

Bevor der HypoGen-Algorithmus angewendet werden konnte, musste zunächst für jede Verbindung des *training sets* ein Konformationsmodell erstellt werden, welches die Flexibilität eines jeden Moleküls berücksichtigt. In CATALYST® beinhaltet ein solches Modell eine repräsentative Anzahl von energetisch denkbaren Konformeren.

Eine Konformationsanalyse mit „bester“ oder eine mit „schneller“ Qualität stehen in CATALYST® prinzipiell zur Auswahl. Für den vorliegenden Fall wurde eine Analyse mit „bester“ Qualität durchgeführt. Dabei wurde ein Maximum von 250 Konformeren in einem Energiebereich von 85 kJ/mol zum Energieminimum generiert. Die Bildung von Konformeren mit „bester“ Qualität sollte immer angewendet werden, wenn es gilt ein pharmakophores Modell zu erstellen.^[276]

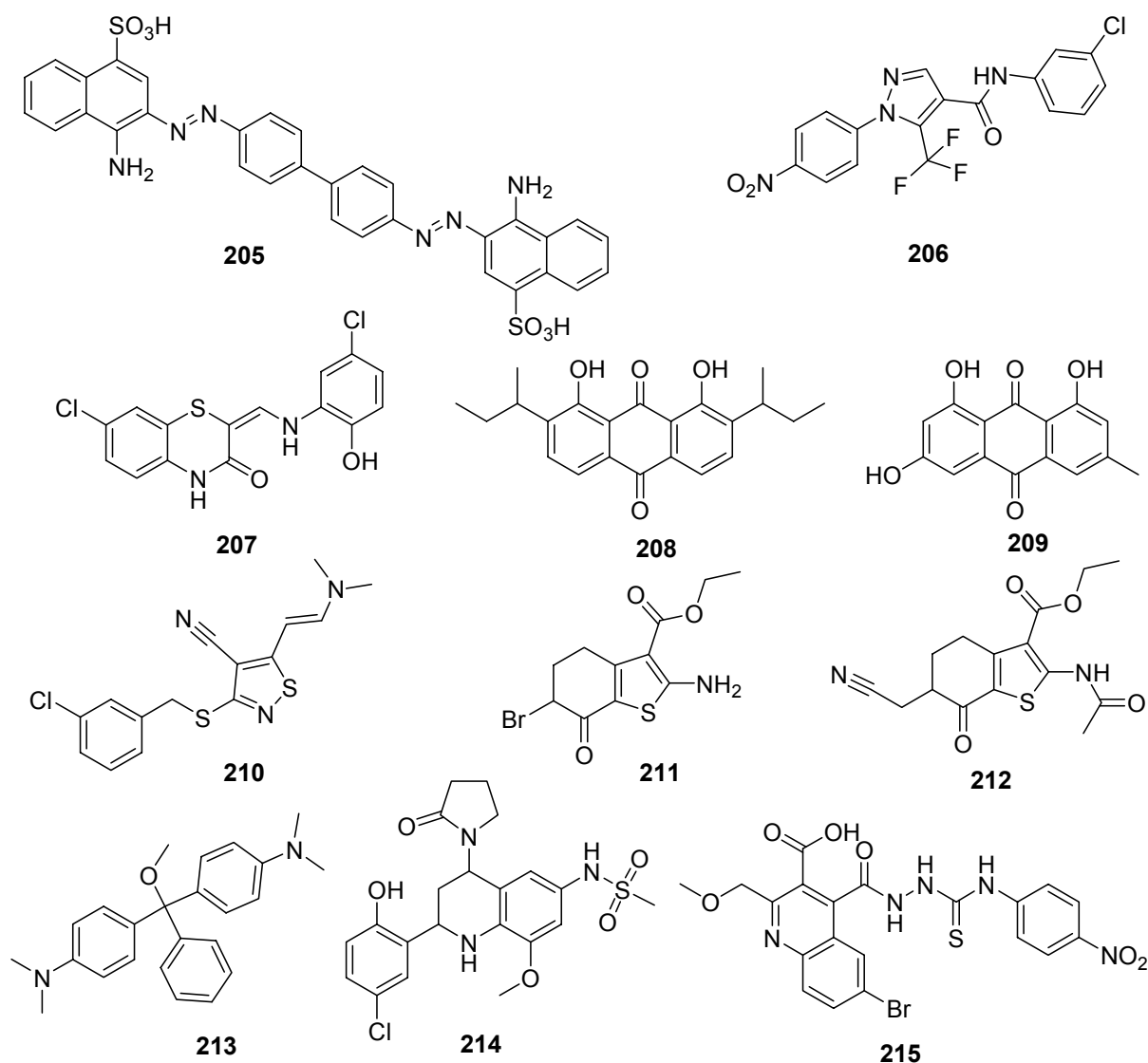


Abbildung 8.1. Strukturen des *training sets* 205-215.

Durch Anwendung des HypoGen-Algorithmus konnten zehn pharmakophore Hypothesen erhalten werden. Nach manueller Auswahl wurden drei Modelle ausgesucht, die für das virtuelle Screening der Maybridge Datenbank *Screening Collection* (Oktober 2004) verwendet wurden. Diese enthält 59676 kommerziell erhältliche Verbindungen mit gutem pharmakologischem Profil.

In CATALYST[®] existieren zwei Varianten, mit denen Datenbanken nach einem durch die Hypothese vorgegebenes Muster durchsucht werden können. Der *Fast Flexible Search* Befehl benutzt dabei bereits existierende Konformere der Datenbank, wobei das *Best Flexible Search* Kommando diese erst während der Suche berechnet. Außerdem besitzt CATALYST[®] eine Größe, die darüber Auskunft gibt, wie gut ein Treffer auf das entsprechende Modell mit den jeweiligen Eigenschaften passt. Bei der vorliegenden Suche wurde ein *Minimum Fit* Wert von 3.5 in Kombination mit der *Best Flexible Search* Methode verwendet.

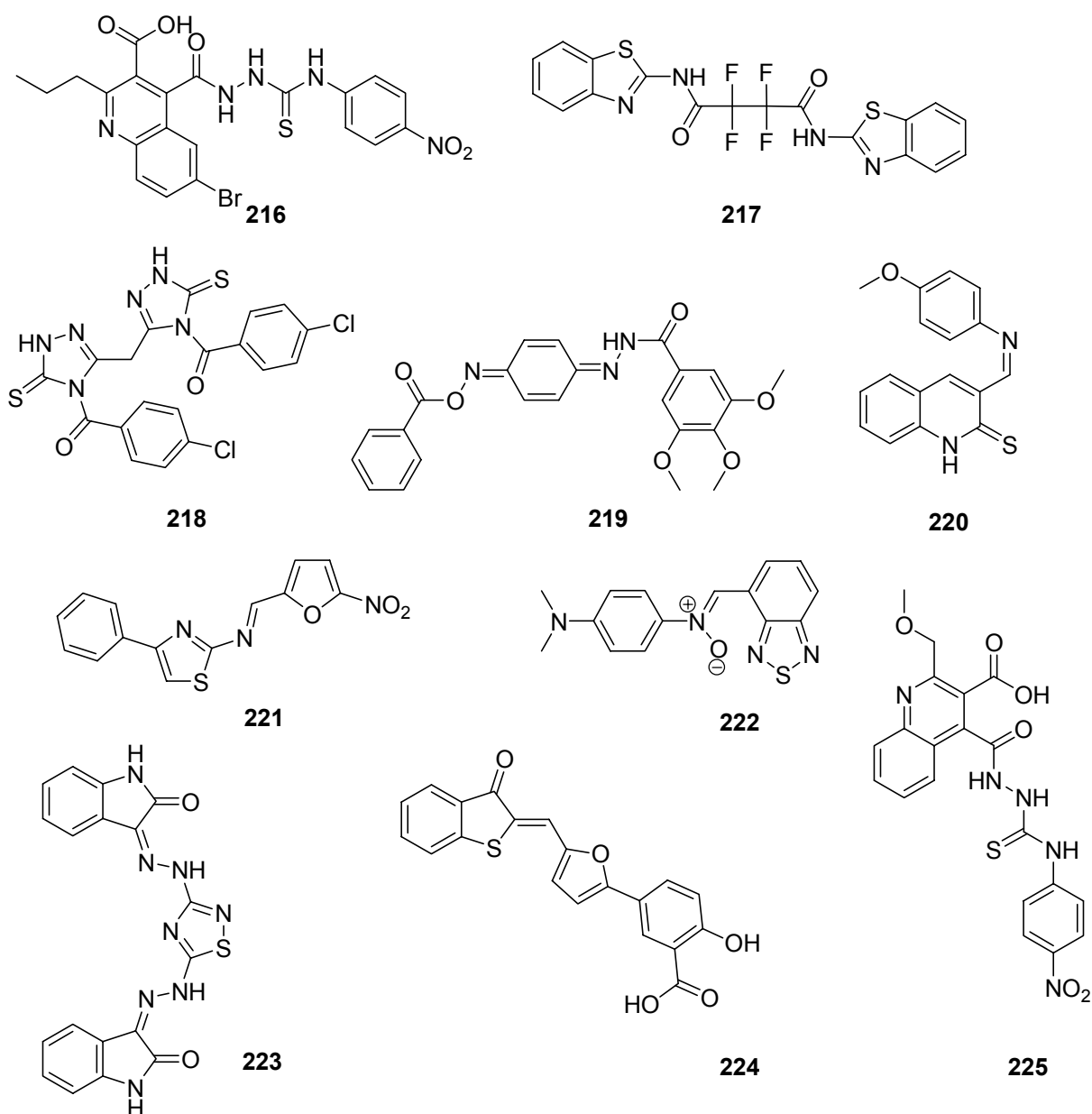


Abbildung 8.2. Strukturen des *training sets* 216-225.

8.3 Algorithmen in CATALYST[®]

8.3.1 Konformationsanalyse

Chemische Bindungen sind keineswegs starre Gebilde, wie zweidimensionale Darstellungen vielleicht vermuten lassen. Sie sind abhängig von sterischen Wechselwirkungen und dem sich daraus ergebenden Potential mehr oder weniger frei drehbar. Dadurch haben selbst einfache Moleküle keine streng definierte Gestalt, sondern können mehrere Konformationen einnehmen.

Eine Transformation von einer in eine andere Konformation ist hauptsächlich auf Veränderungen der Torsionswinkel von Einfachbindungen zurückzuführen. Der Torsionswinkel wird über die Winkelstellung zweier Substituenten einer frei drehbaren Bindung definiert. Stehen diese auf Deckung, entspricht dies 0°. Diese Stellung wird als vollklipische oder synperiplanare Konformation bezeichnet und ist durch das Gegenüberstehen der beiden Substituenten die energetisch ungünstigste Position.

Der Konformationsraum einer Verbindung kann als Menge aller möglichen Geometrien betrachtet werden, die unter Beachtung der Konstitution und Konfiguration realisierbar sind. Eine energetische Beurteilung des gesamten Konformationsraumes einer chemischen Struktur liefert ihre Energie- oder Potentialhyperfläche. Jeder Punkt auf dieser Fläche entspricht einer diskreten Konformation und dem dazugehörigen Energieinhalt. Stabile Konformere von Molekülen korrespondieren dabei zu lokalen Minima auf dieser Energiefunktion. Hochenergetische Konformationen wiederum können durch so genannte van-der-Waals-Verletzungen zustande kommen. Eine Verletzung tritt dann ein, wenn sich zwei Atome näher kommen als $\frac{3}{4}$ des Abstandes ihrer addierten van-der-Waals Radien.

Bekannte Beispiele für verschiedene Konformationen eines Moleküls sind die gestaffelten und ekliptischen Formen von Ethan, die anti-trans und gauche Formen von *n*-Butan oder die Boot- und Sesselkonformation des Cyclohexans. Die Rotation über die C_{sp3}-C_{sp3} Bindung im Ethanmolekül kann über eine Sinuskurve der potentiellen Energie beschrieben werden. Die Energieminima liegen dabei bei 60°, 180°, und 300° und können den gestaffelten Formen zugewiesen werden, während die Maxima bei 120°, 240° und 360° zu finden sind und mit den ekliptischen Formen korrespondieren. Die entsprechenden Konformationen der Maxima sind unter Standardbedingungen unüblich, weshalb bei physikalischen oder chemischen

Betrachtungen lediglich die gestaffelten Konformation berücksichtigt werden müssen. Diese klare Situation ändert sich, wenn es um Betrachtungen von größeren und flexibleren Molekülen geht. Diese existieren bei Raumtemperatur in vielen energetisch möglichen Rotameren. Zum Beispiel liegen bei Raumtemperatur schätzungsweise 70% des *n*-Butans in der anti-trans und 30% in der *gauche* Konformation vor.^[277] Bei einer Diskussion der physikalischen oder chemischen Eigenschaften müssen deshalb beide Strukturen ihre Berücksichtigung finden.

Die Anzahl der möglichen Konformere ist von der Art der Atome oder Gruppen, die an einer drehbaren Bindung beteiligt sind, abhängig. In der Regel gibt es ein globales Energieminimum, dem die energetisch günstigste Konformation entspricht, sowie mehrere etwas weniger günstige Konformationen, die an lokalen Energieminima stabilisiert werden. Es wird angenommen, dass die biologische Aktivität eines Wirkstoffes von einer einzelnen Konformation aus der Reihe der Niedrigenergie-Konformere abhängt.^[278] Diese bioaktive Struktur muss dabei keineswegs der Konformation mit der niedrigsten Energie entsprechen. Energetisch ungünstige Konformationen können allerdings ausgeschlossen werden. Die Identifizierung von Niedrigenergie-Konformationen ist ein wichtiger Teil im Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und biologischer Aktivität einer Verbindung und stellt eine große Herausforderung für das Wirkstoffdesign dar.

Eine Konformationssuche beginnt zunächst mit der Erzeugung einer geeigneten Startgeometrie. Diese Startgeometrie wird dann geometrisch und energetisch optimiert bis ein Minimum gefunden wurde. Anschließend wird überprüft, ob das Minimum nicht schon vorher gefunden wurde. Wenn nicht, wird diese neue Konformation abgespeichert. Danach erzeugt der Konformationsgenerator die nächste Geometrie. Um die Konformationsanalyse effizienter zu gestalten, wird jede Startgeometrie vor der Optimierung auf Atomüberlagerungen oder zu enge van-der-Waals Kontakte hin überprüft. Solche Startgeometrien werden verworfen, wodurch der zu durchsuchende Konformationsraum etwas kleiner wird.

Zur Erzeugung der Startgeometrien stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In wissensbasierten Ansätzen werden vorhandene experimentelle Daten (NMR, Röntgenstrukturanalysen usw.) zur Generierung dreidimensionaler Molekülmodelle ausgenutzt.

Einem anderen Verfahren liegt ein mechanisches Molekülmodell zugrunde. In diesem werden die Atome als Kugeln mit definierter Masse und die Bindungen als

Federn betrachtet. Mittels Newtonscher Mechanik und der Elektrostatik können energetisch günstige dreidimensionale Konformationen verschiedener Moleküle berechnet werden. Die sterische Energie bei diesen Kraftfeldmethoden setzt sich aus mehreren Energiebeiträgen zusammen. Sie ist abhängig von der Energieänderung bei Bindungsdehnung oder -stauchung, bei Bindungswinkeldehnung oder -stauchung, bei Rotation um eine Bindung (Torsion), durch van-der-Waals-Interaktionen (Anziehung-Abstoßung) und durch elektrostatische Interaktionen (Anziehung-Abstoßung). Das Molekül sucht einen energetisch möglichst günstigen Kompromiss, d. h. es wird eine Konformation einnehmen, in der die Deformation von Bindungslängen und Bindungswinkeln möglichst gering ist, günstige Torsionswinkel eingenommen werden und möglichst viele attraktive und möglichst wenig repulsive van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Die Gesamtenergie einer bestimmten Konformation setzt sich aus Energietermen zusammen, die die Energieänderungen bei den genannten Phänomenen beschreiben. Es ergibt sich folgende Potentialenergiefunktion:

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{van-der-Waals}} + E_{\text{elektrostatische Wechselwirkung}} \quad (8.1)$$

Die Energieterme (Einzelpotentiale) werden unabhängig voneinander berechnet und dann zur Gesamtenergie aufsummiert. Aus der so berechneten Energielage kann die wahrscheinliche Existenz der momentanen Molekülgeometrie abgeschätzt werden.

Eine weitere Methode ist die der quantenchemischen Berechnungen basierend auf der Schrödinger-Gleichung. Hierbei werden *ab initio* Verfahren, wobei keine empirischen Parameter inkorporiert sind, von den semiempirischen Methoden unterschieden. Es handelt sich dabei um sehr rechenintensive Verfahren, weshalb sie je nach Molekülgröße nur eine begrenzte Anwendbarkeit besitzen.

Die heute verwendeten Konformationsanalyse-Algorithmen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: eine systematische (*quasi-exhaustive*) Konformationssuche und eine zufällige Konformationssuche.

Die Konformationsanalyse versucht typischerweise den Konformationsraum eines Moleküls mit einer begrenzten Zahl von Niedrigenergie-Konformeren darzustellen.

Bei systematischen Methoden wird der Konformationsraum gleichmäßig durchschritten und jedes Konformer auf seinen energetischen Zustand hin überprüft. Der energetisch günstigste wird dann als globales Minimum auf der Energiehyperfläche angesehen. Das älteste Verfahren des Durchsuchens des

Konformationsraums ist die Rastersuche. Dabei werden die vorhandenen frei drehbaren Bindungen systematisch um einen konstanten Winkel gedreht. Mitbegründet wurde diese Methodik durch Pionierarbeiten von Lipton und Still^[278] sowie von Dammköhler.^[280] Für Pentan mit zwei drehbaren Bindungen und bei einem Winkelinkrement von 120° ergibt das neun Möglichkeiten. Jedoch steigt die Zahl der Möglichkeiten mit feiner werdendem Suchraster (kleinerem Winkelinkrement) und steigender Bindungsanzahl stark an. Die Möglichkeiten für k drehbare Bindungen und ein Raster von n Grad berechnen sich mit: $(360^\circ/n)^k$. Für ein Molekül mit sechs solcher drehbaren Bindungen und einem Raster von 30° wären dies schon 2 985 985 Millionen Startgeometrien, die zu optimieren wären.

Bei der zufälligen Suche werden die frei drehbaren Bindungen um einen zufälligen Betrag gedreht. Meistens geht man dabei von der Geometrie der letzten Iteration aus. Das heißt, nachdem ein Minimum gefunden ist, ändert man die Torsionswinkel zufällig. Dadurch erhält man eine neue Startgeometrie, die dann wieder optimiert wird. Der Konformationsraum wird dabei für einen gewissen Zeitraum abgesucht. Je länger die Zeitperiode gewählt wird, desto besser sollte dabei der Konformationsraum abgedeckt sein. Die verschiedensten Methoden können bei dieser Art von Suche verwendet werden: Distanzgeometrieverfahren,^[281] Moleküldynamik-Methoden^[282] und Monte Carlo Verfahren.^[283] Allen Varianten liegt ein Konzept zugrunde, das versucht die Anzahl der ermittelten Konformationen klein zu halten, indem sie die resultierenden Ergebnisse durch so genanntes *clustern* in verwandte Gruppen einteilt.

Keine der erwähnten Methoden garantiert allerdings, dass der komplette Konformationsraum vollständig abgedeckt wird. Während sich die systematische Suche auf Punkte eines Suchgitters beschränkt, beinhaltet die zufällige Suche einen systematischen Fehler, so dass wichtige Konformationen bei beiden Modellen fehlen könnten. Ein weiteres Problem liegt in der Bildung enormer Datenmengen. Bei den beschriebenen Methoden ist es durchweg üblich, dass hunderte bzw. tausende potentielle Konformationen gebildet werden, um schließlich verschiedene Strukturfamilien erhalten zu können. Der Konformationsunterschied innerhalb einer solchen Familie ist oft sehr klein, weshalb der größte Teil der Informationen überflüssig erscheint. Auf der anderen Seite fehlen oft Konformationen, die sich strukturell von Konformationen eines lokalen Minimums unterscheiden, die aber energetisch doch sehr nahe liegen.^[284]

8.3.1.1 Der Poling-Algorithmus

Eine große Herausforderung der Konformationsanalyse ist es, mit einer möglichst kleinen Zahl an Konformeren den kompletten Konformationsraum eines Moleküls repräsentativ abzudecken. Das Softwarepaket CATALYST[®] verwendet dafür eine von Smellie et al. entwickelte Technik.^[284-286] Dabei wird einem Kraftfeld zur Berechnung eines Niedrigenergie-Konformers ein Extraterm zugefügt, welcher dafür sorgt, dass sich die gebildeten Konformationen bestmöglich voneinander unterscheiden. Abgeleitet von dem mathematischen Begriff der Definitionslücken, den so genannten Polstellen, wird dieser Extraterm *Poling*-Funktion genannt.

Bei der Betrachtung der Energiefunktionen von Abb. 8.3 können zwei lokale Energieminima festgestellt werden. Bei Anwendung herkömmlicher Konformationsanalyse-Techniken, um eine begrenzte Anzahl an Konformeren zu erzeugen, könnten lediglich zwei Strukturen gefunden werden: eine bei jedem Minimum. Durch Einführung eines *Poling*-Terms im abschließenden Energieminimierungsschritt wird der Konformationsraum besser abgedeckt. In den Beispielen ist zu sehen, dass das Konformer aus der ersten Iteration (C1) in einem der beiden Minima gefunden wird. Bei der 2. Iteration tritt an Stelle von C1 eine Definitionslücke. Diese Polstelle ist symmetrisch und strebt ins Unendliche, wenn die Differenz des zu generierenden Konformers (C2) und der vorigen Struktur C1 gegen Null strebt. Beim Start der dritten Iteration wird eines der lokalen Minima schon von zwei Strukturen abgedeckt, so dass Konformer 3 (C3) für das übrig gebliebene Minimum erzeugt wird.

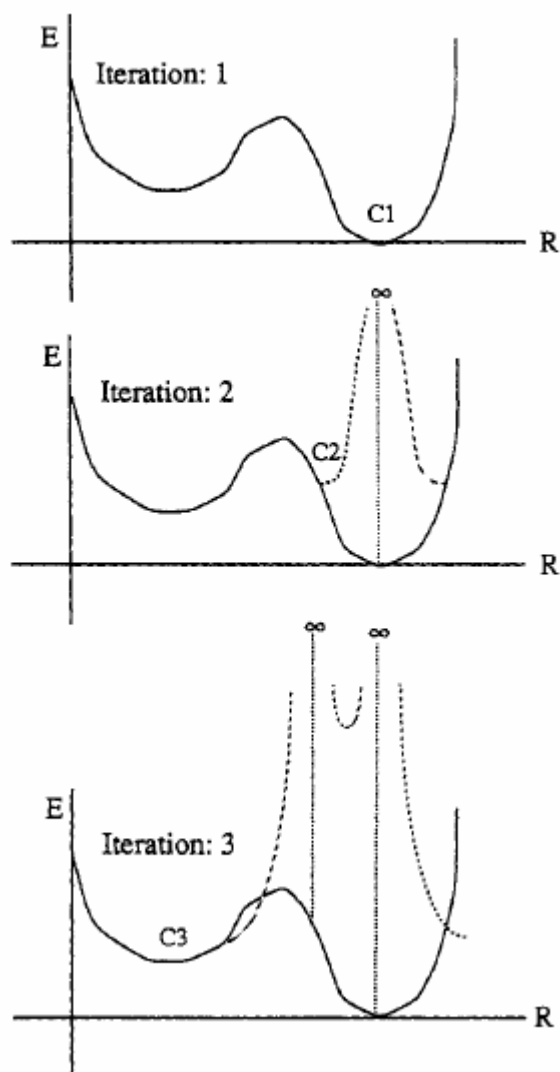


Abbildung 8.3. Effekt des Poling-Terms auf den Konformationsraum.^[284]

In CATALYST® stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Durchführung einer Konformationsanalyse zur Auswahl: eine so genannte Technik der *best quality* und eine Methode der *fast generation*. Das Konzept der *best quality* deckt den Konformationsraum detaillierter ab als die *fast*-Methode, diese braucht allerdings weniger Rechenzeit, da sie den *Poling*-Algorithmus nur unter bestimmten Umständen verwendet.

Wie bereits erwähnt wird die *Poling*-Funktion einfach zu einem moleküldynamischen Kraftfeld wie bei Gl. 8.2 als Zusatzterm addiert.

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{van-der-Waals}} + E_{\text{elektrostatische Wechselwirkung}} + E_{\text{pole}} \quad (8.2)$$

Der zusätzliche *Poling*-Term verhindert dabei die Bildung von überflüssigen Konformationen und verbessert gleichzeitig die Abdeckung des Konformationsraums. Die verallgemeinerte funktionale Form eines *Poling*-Terms ist in Gl. 8.3 und 8.4 dargestellt.

$$E_{\text{pole}} = W_{\text{pole}} \sum_i \frac{1}{(D_i)^N} \quad (8.3)$$

$$D_i = \left(\frac{\left(\sum_{j=1} (d_j - d_{ij})^2 \right)}{N_d} \right)^{1/2} \quad (8.4)$$

Dabei ist D_i die Wurzel aus dem Mittelwert des Quadrats (rms = *root mean square*) der Differenz zwischen der *Poling*-Distanz der Konformation d_j , die gerade *gepolt* wird, und der korrespondierenden Distanz der i ten vorherigen Konformation d_{ij} berechnet für alle N_d *Poling*-Distanzen. Das Gewicht W_{pole} kontrolliert die Größe der Energie, den der *Poling*-Term zum Energiegesamtwert beiträgt. Da die Energie der *Poling*-Funktion aus Gl. 8.3 mit ihrer Dimension an die anderen Energiewerte der Gesamtenergie angepasst sein sollte, wird die Größe von W_{pole} nach der Bildung einiger Konformationen in CATALYST[®] automatisch skaliert. Falls die *Poling*-Energie zu hoch sein sollte, stoßen sich gebildete Konformere in dem Maße ab, dass es schnell unmöglich wird neue Niedrigenergie-Konformere zu finden. Falls die *Poling*-Energie dagegen zu niedrig ist, werden Konformere gebildet, die sich kaum voneinander unterscheiden. Der Ausgangswert für W_{pole} wird für eine bekannte Energie (E_k) bei einer bekannten Interkonformer-Distanz (D_k) über folgende Gl. 8.5 bestimmt.

$$W_{\text{pole}} = F_k (D_k)^N \quad (\text{Gl. 8.5})$$

Bei der Wahl jeder möglichen interatomaren Distanz als *Poling*-Distanz (N_d in Gl. 8.4) wäre die Konformationsanalyse sehr verlangsamt und leistungsunfähig. Deshalb werden lediglich die topologisch wichtigen chemischen Merkmale eines Moleküls (Wasserstoffbrücken-Akzeptor, Wasserstoffbrücken-Donor und hydrophobe

Gruppen) ausgewählt und deren mögliche Abstände für die *Poling*-Funktion verwendet. Eine steigende Anzahl der chemischen Merkmale (*features*) einer Verbindung lässt die Rechenzeit schnell explosionsartig wachsen, weshalb in CATALYST® eine maximale *Poling*-Distanz pro Merkmal festgelegt wird. Die kombinierten Distanzen entsprechen dem totalen Wert der *Poling*-Distanz N_d .

8.3.2 Der HypoGen-Algorithmus

Zur Bildung eines pharmakophoren Modells stehen in CATALYST® zwei Methoden zur Auswahl: der HypoGen-Algorithmus und die HipHop-Funktion.

HypoGen generiert dreidimensionale Hypothesen auf der Grundlage von biologischen Aktivitäten verschiedener Substanzen eines *training sets*. Ein HipHop-Modell hat dagegen lediglich qualitative Aussagekraft. Es wird angewendet, wenn nur eine kleine Anzahl von aktiven Verbindungen vorhanden ist bzw. wenn keine biologischen Daten der aktiven Substanzen vorliegen.

Der HypoGen-Algorithmus durchläuft einen iterativen Prozess, welcher aus 3 Hauptzyklen besteht (Abb. 8.4). In einer ersten konstruktiven Phase (Abb. 8.5) werden zunächst die acht Substanzen mit den höchsten Aktivitäten eines *trainig sets* nach Gl. 8.6 bestimmt und die Konformationen der beiden „aktivsten“ mit den sechs übrigen verglichen.

$$MA \times \text{Unc}_{MA} - \frac{A}{\text{Unc}_A} > 0.0 \quad (\text{Gl. 8.6})$$

Abbkürzungen: Unc = *uncertainty*; MA = Aktivität der *most active compound*; A = Aktivität der *active compound*.

Es entsteht ein Datensatz verschiedener pharmakophorer Modelle. Diese werden in der subtraktiven Phase (Abb. 8.6) mit den Konformeren der weniger potenten Substanzen auf Ähnlichkeiten untersucht und von denjenigen Modellen befreit, die mit mehr als der Hälfte ihrer Merkmale mit den wenig aktiven Verbindungen übereinstimmen. Die *least active compounds* des *training sets* können nach Gl. 8.7 errechnet werden.

$$\log(A) - \log(MA) > 3.5 \quad (\text{Gl.8.7})$$

Alle Substanzen, die um 3,5 Größenordnungen von der „aktivsten“ Verbindung abweichen, werden folglich als *least active molecules* bezeichnet. Der Wert von 3.5 ist dabei keine festgeschriebene Größe und muss von dem CATALYST-Benutzer an das verwendete *training set* angepasst werden.

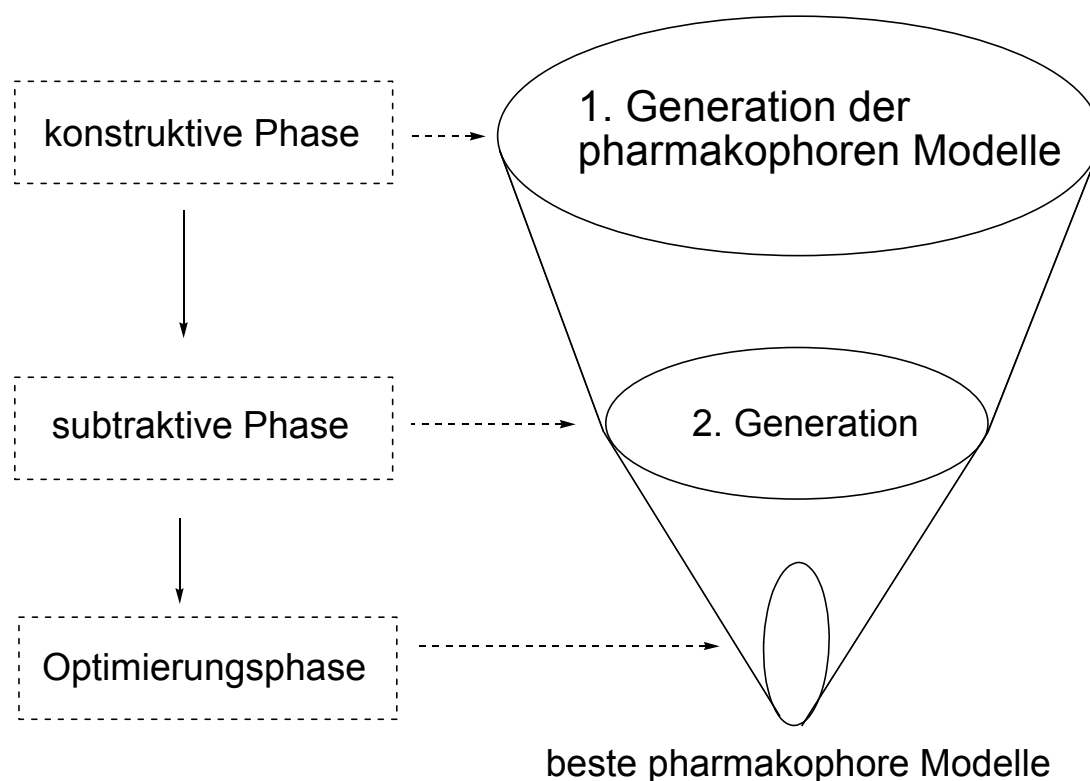


Abbildung 8.4. Phasen des HypoGen-Algorithmus.

In der Optimierungsphase werden die verbliebenen pharmakophoren Modelle durch Variation der räumlichen Anordnung ihrer Merkmale verändert und mittels einer so genannten Kostenrechnung bewertet. Wie aus Gleichung 8.8 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den *Totalcost* um die Summe der Kosten von *weight*, *error* und *configuration*.

$$\text{Totalcost} = eE + wW + cC \quad (\text{Gl.8.8})$$

Abbkürzungen: E = error; e = error coefficient; W = weight; w = weight coefficient; C = configuration; c = configuration coefficient.

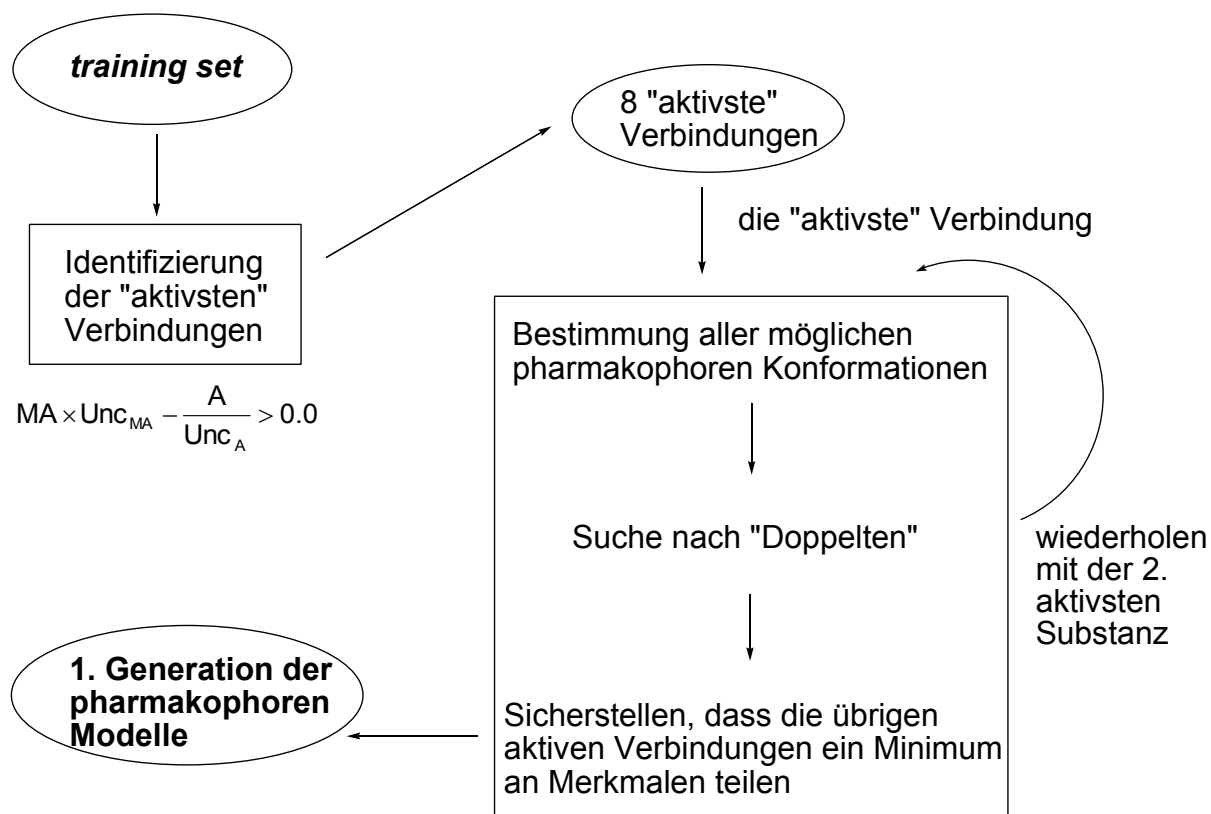


Abbildung 8.5. Schema der konstruktiven Phase des HypoGen-Algorithmus.

Die Optimierungsphase endet, wenn die Variation der Hypothesen keine Verbesserung der *Totalcosts* zur Folge hat. Die zehn *top scoring* pharmakophoren Modelle werden als Ergebnis dargestellt.

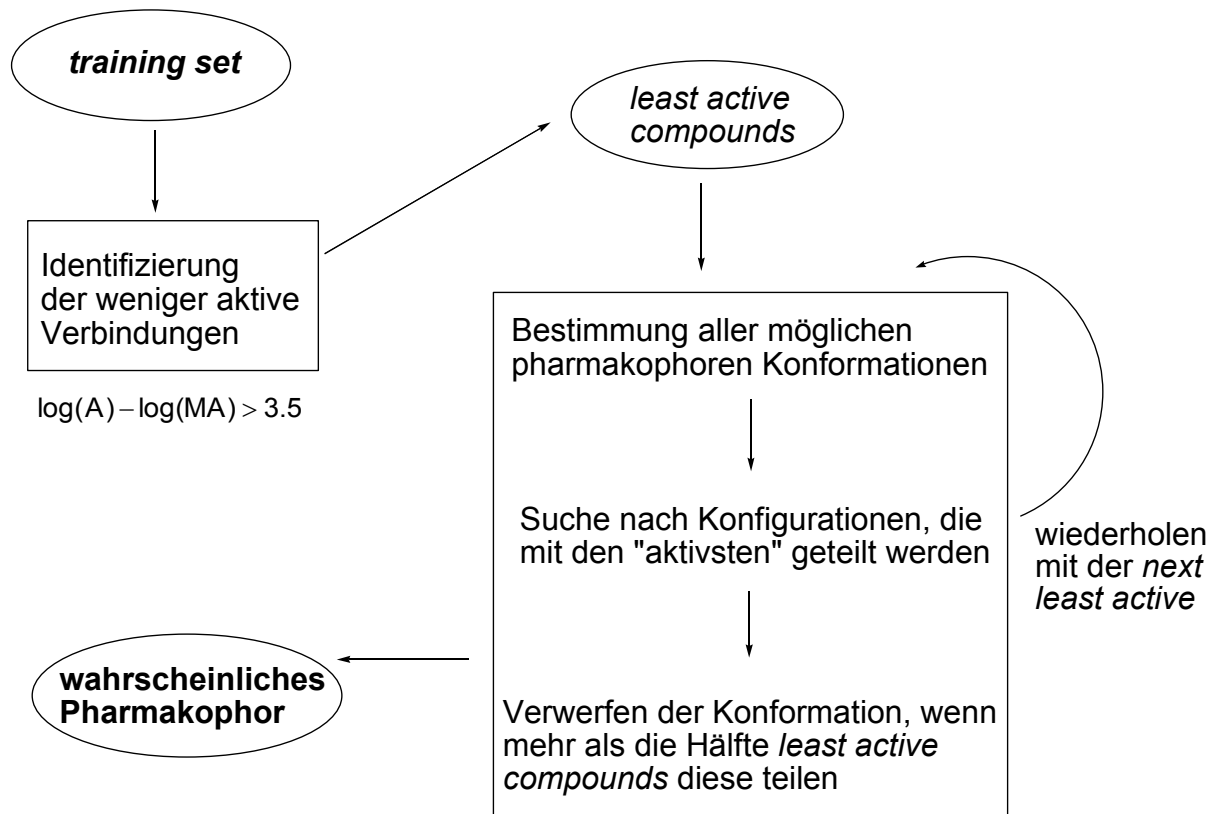


Abbildung 8.6. Schema der subtraktiven Phase des HypoGen-Algorithmus.

8.4 Ergebnisse & Diskussion des virtuellen Screenings

Die Bildung der Hypothesen wurde auf die in Kapitel 8.2 beschriebene Art durchgeführt. Die resultierenden zehn pharmakophoren Modelle für die Tau-Aggregations-Inhibitoren enthalten jeweils vier Merkmale - so genannte *features* - mit variierender Anzahl an hydrophoben Regionen, Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und aromatischen Resten. Die Qualität der einzelnen Hypothesen kann auf unterschiedliche Weise beurteilt werden. CATALYST® stellt eine so genannte Kostenabschätzung für jede generierte Hypothese zur Verfügung. Nach dem *Ockhams razor*-Prinzip wird dasjenige Modell als bestes betrachtet, welches die geringsten Kosten besitzt. Es handelt sich dabei um ein in vielen Bereichen der Wissenschaft angewendetes Sparsamkeitsprinzip. Grundgedanke dieser Theorie ist die Vermutung, dass von mehreren Theorien, die den gleichen Sachverhalt erklären, die einfachste zu bevorzugen ist.

Eine andere Möglichkeit, um die Qualität einer Hypothese abzuschätzen, besteht darin, die jeweilige Aktivität der Substanzen des *training sets* mittels der jeweiligen Modelle berechnen zu lassen, und die Ergebnisse mit den experimentell ermittelten Werten dieser Verbindungen zu vergleichen. Je besser die berechneten Aktivitäten mit den experimentell gemessenen Werten übereinstimmen, desto plausibler erscheint eine Hypothese. Substanzen außerhalb eines *training sets* sollten natürlich ebenfalls mit annähernder Aktivität berechnet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Validierung der einzelnen pharmakophoren Modelle angewendet. Sie bietet einen größeren Spielraum für subjektive Entscheidungen, was unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die genaue Wirkweise der einzelnen Tau-Aggregations-Inhibitoren unklar ist und völlig unterschiedlich sein könnte, ratsam erscheint.

Zur weiteren Bestätigung wurden die beiden Verbindungen mit der höchsten Aktivität unter Verwendung der *Best Flexible Fit*-Methode mit den einzelnen Hypothesen überlagert. Diejenigen Modelle scheinen dabei die sinnvollsten zu sein, bei denen für die Konformere mit niedriger potentieller Energie die genauesten Aktivitäten berechnet werden konnten.

Drei Hypothesen wurden letztendlich ausgesucht und für das virtuelle Screening eingesetzt. Jedes dieser drei Modelle besitzt zwei aromatische Ringe, eine hydrophobe Region und einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor (Abb. 8.7).

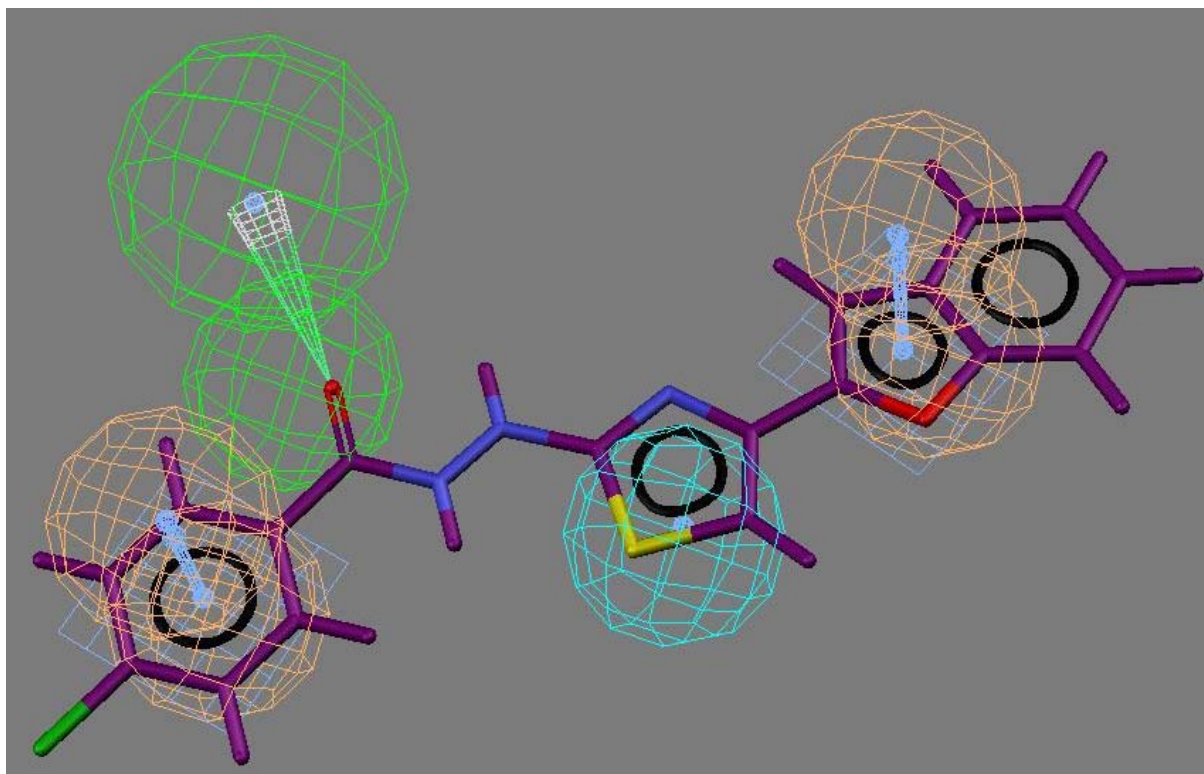


Abbildung 8.7. Verbindung **250** überlagert mit einem 4-*feature* pharmakophoren Modell. Aromatische Region (braun), hydrophober Bereich (blau), Wasserstoffbrücken-Akzeptor (grün).

Beim Überlagern der Hypothesen mit den Verbindungen der höchsten Aktivität fällt auf, dass jede dieser Verbindung einen zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Akzeptor beinhaltet, welcher bei der automatischen Generierung der Modelle nicht auftaucht. Aus diesem Grund wurde bei einer Hypothese ein solches Merkmal manuell eingefügt und ebenfalls zur Datenbanksuche eingesetzt. Dieses fünf-*feature* pharmakophoren Modell ist in Abb. 8.8 dargestellt.

Das virtuelle Screening wurde mit den in Kapitel 8.2 beschriebenen Kriterien und einem *Minimum Fit* von 3.5 für die vier-*feature* Hypothese sowie einem Wert von 4 bei dem fünf-*feature* Modell durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine Trefferliste von 136 potentiellen Tau-Aggregations-Inhibitoren erhalten werden. Nach Sortierung dieser Substanzen in verschiedene chemisch verwandte Gruppen wurden zufällig 19 Verbindungen ausgesucht, die in Kooperation mit der Gruppe um Eckhard Mandelkow zur Validierung der Modelle auf ihre biologische Aktivität getestet wurden.

Der biologische Test basiert auf einem Aggregations-Assay, welcher die Tatsache ausnutzt, dass der Farbstoff Thioflavin-S (ThS) seine spektralen Eigenschaften während der Aggregation von Tau verändert (Abb. 8.9).^[132]

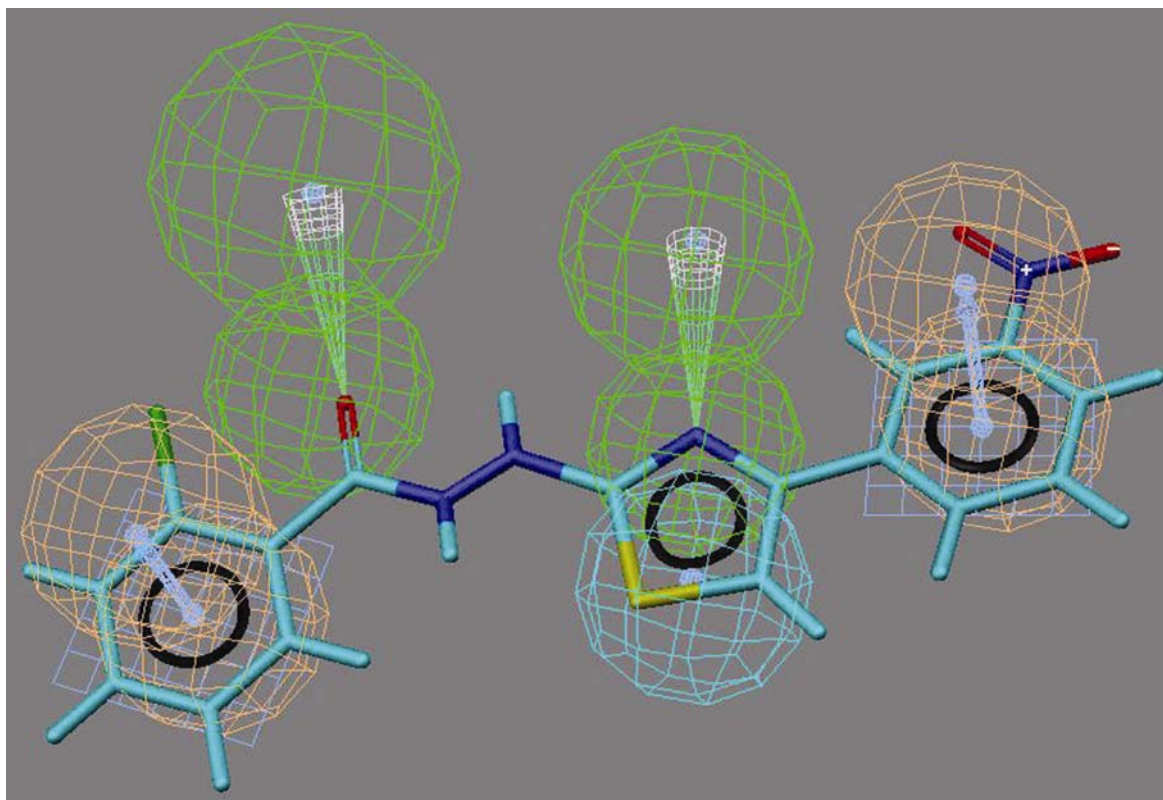


Abbildung 8.8. Verbindung **246** überlagert mit einem 5-*feature* pharmakophoren Modell. Aromatische Region (braun), hydrophober Bereich (blau), Wasserstoffbrücken-Akzeptor (grün).

Als Ergebnis der biologischen Untersuchung konnten zwei Verbindungen (**235**, **241**) identifiziert werden, die einen vergleichbaren Einfluss auf die Hemmung der Tau-Aggregation haben wie die potentesten Verbindungen aus dem *training set* (Abb. 8.10, Abb. 8.11). Die Substanzen **229**, **230**, **236** und **239** sind ebenfalls als Tau-Aggregations-Inhibitoren aktiv, weisen allerdings deutlich geringere IC_{50} -Werte auf. Vergleicht man die beiden aktivsten Verbindungen des Screenings, so wird deutlich, dass Substanz **241** als Michael-Akzeptor mit großer Wahrscheinlichkeit von Toxizitätsproblemen begleitet sein dürfte.^[287] Als mögliche Kandidaten für eine Wirkstoffentwicklung kommen Substanzen dieser Strukturklasse deshalb nicht in Frage.

Bei Verbindungen mit dem Grundgerüst von Molekül **235** kann dagegen kein Bedenklichkeitsaspekt festgestellt werden, weshalb weitere Substanzen von Maybridge gekauft und mittels ThS-Assay auf ihr Potential als Aggregations-Inhibitor getestet wurden. Die Ergebnisse sind der Abb. 8.12 zu entnehmen.

Die Aktivität der Ausgangsverbindung konnte von keiner der in der 2. Generation getesteten Substanzen erreicht werden. Einige dieser Verbindungen hemmen

allerdings die Tau-Aggregation annähernd im gleichen Bereich, so dass die entsprechende Verbindungsklasse als guter Startpunkt für weitere Entwicklungen anzusehen ist.

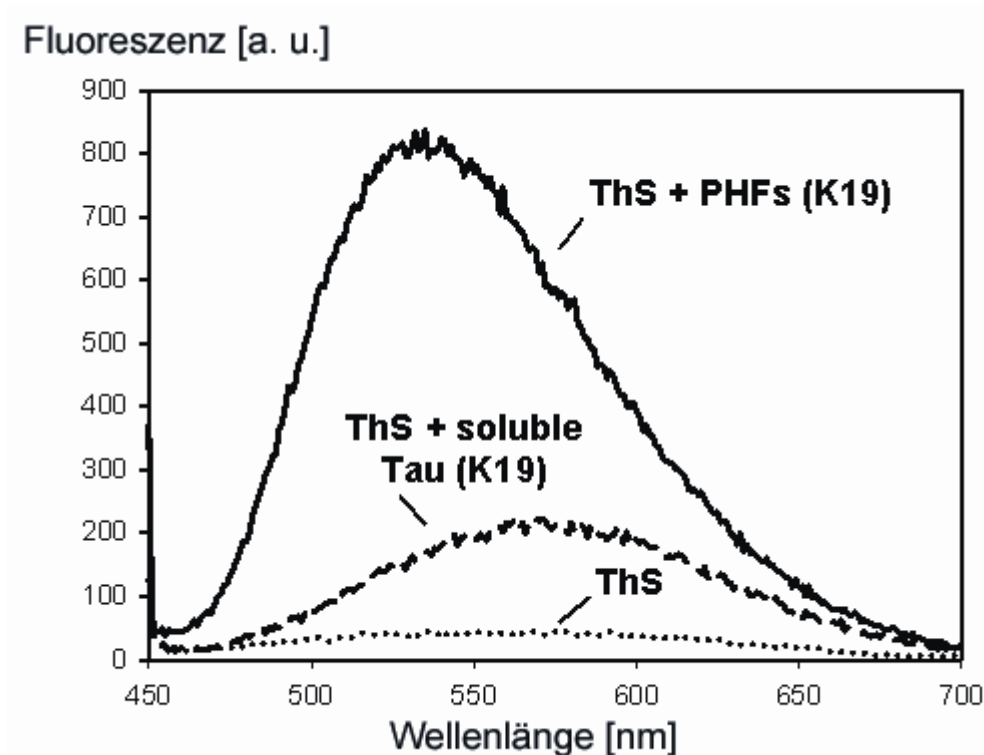


Abbildung 8.9. Veränderung der spektralen Eigenschaften von Thioflavin-S während der Aggregation von Tau. Die ThS-Fluoreszenz kann verwendet werden, um die Aggregation von Tau in *paired helical filaments* (PHFs) zu messen. a.u. = arbitrary unit. Das Maximum der ThS-Fluoreszenz bei 521 nm wird dabei um ein Vielfaches erhöht und ist proportional zu dem Maße der PHF-Aggregation (ThS (60 μ M), ThS (60 μ M plus lösliches (soluble) Tau-Protein (K19, 10 μ M): ThS (60 μ M) plus PHFs (10 μ M)). Jede Probe hat eine Konzentration von 2% in DMSO und wird vor der Messung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

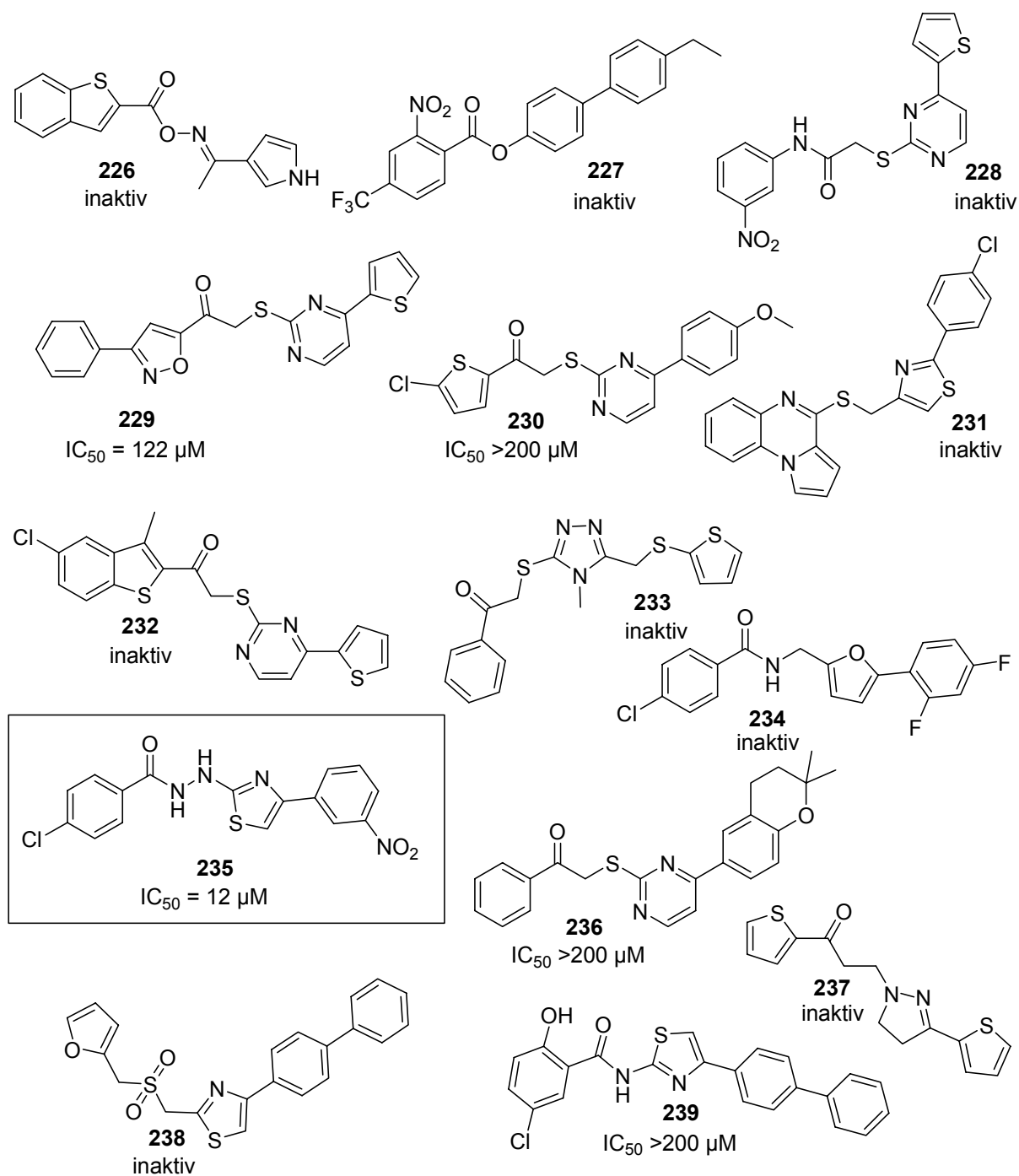


Abbildung 8.10. Strukturen der ausgewählten Verbindungen **226-239** und entsprechende Ergebnisse des biologischen Tests.

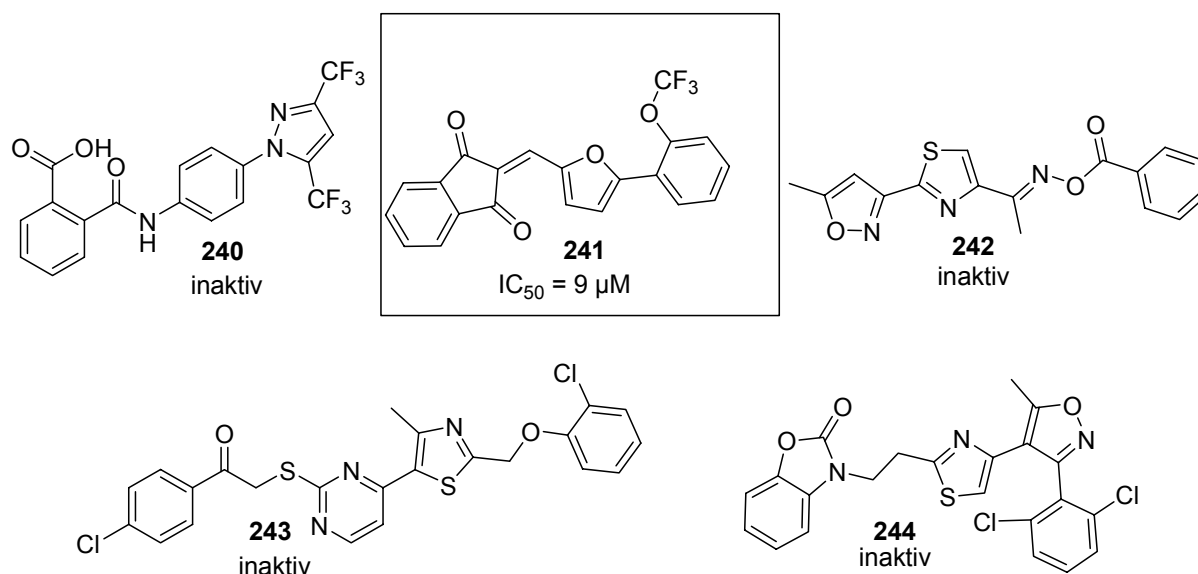


Abbildung 8.11. Strukturen der ausgewählten Verbindungen **240-244** und entsprechende Ergebnisse des biologischen Tests.

8.5 Zusammenfassung & Ausblick

Die Ergebnisse des vorliegenden Projekts verdeutlichen den großen Wert eines ligandenbasierten virtuellen Screenings für die Identifizierung neuer Leitstrukturen mit gutem pharmakologischem Profil. Besonders nützlich erscheint ein solches Konzept vor allem dann, wenn keine dreidimensionalen Informationen eines *targets* vorhanden sind.

Zur Abschätzung der Zelltoxizität der identifizierten Leitstruktur wurde ein Lactatdehydrogenase-Assay (LDH) durchgeführt. LDH ist ein Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und die gleichzeitige Umwandlung von NAD⁺ zu NADH+H⁺ katalysiert. Eine vermehrte Anzahl von geschädigten Zellen führt zu einer Erhöhung der LDH-Enzymaktivität im Kulturmedium. Im LDH-Assay wird die Cytotoxizität von substratbehandelten Zellen photometrisch bei 500 nm durch die Reduzierung von NAD⁺ zu NADH+H⁺ und anschließender Konversion eines gelben Tetrazoliumsalzes zu Formazan (rot) bestimmt und relativ quantifiziert.

Die Ergebnisse können der Tabelle 8.1 entnommen werden und zeigen, dass sowohl einige Verbindungen als cytotoxisch angesehen werden müssen, andere Substanzen dagegen aber relativ unbedenklich sind. Eine generelle Cytotoxizität der Grundstruktur ist bei Betrachtung der Resultate aber auszuschließen.

Die ermittelten IC_{50} -Werte der einzelnen Verbindungen besitzen keinesfalls die Größenordnung um *in vivo*-Experimente anzuschließen. Um weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise der Substanzen sammeln zu können, sollte deshalb das Hauptaugenmerk zunächst auf der Steigerung der Aktivität liegen. Kapitel 9 dieser Arbeit beschreibt die Synthese zahlreicher neuer Strukturvariationen des Grundgerüsts und zeigt auf, welchen Einfluss die Veränderungen auf die Aktivität nehmen.

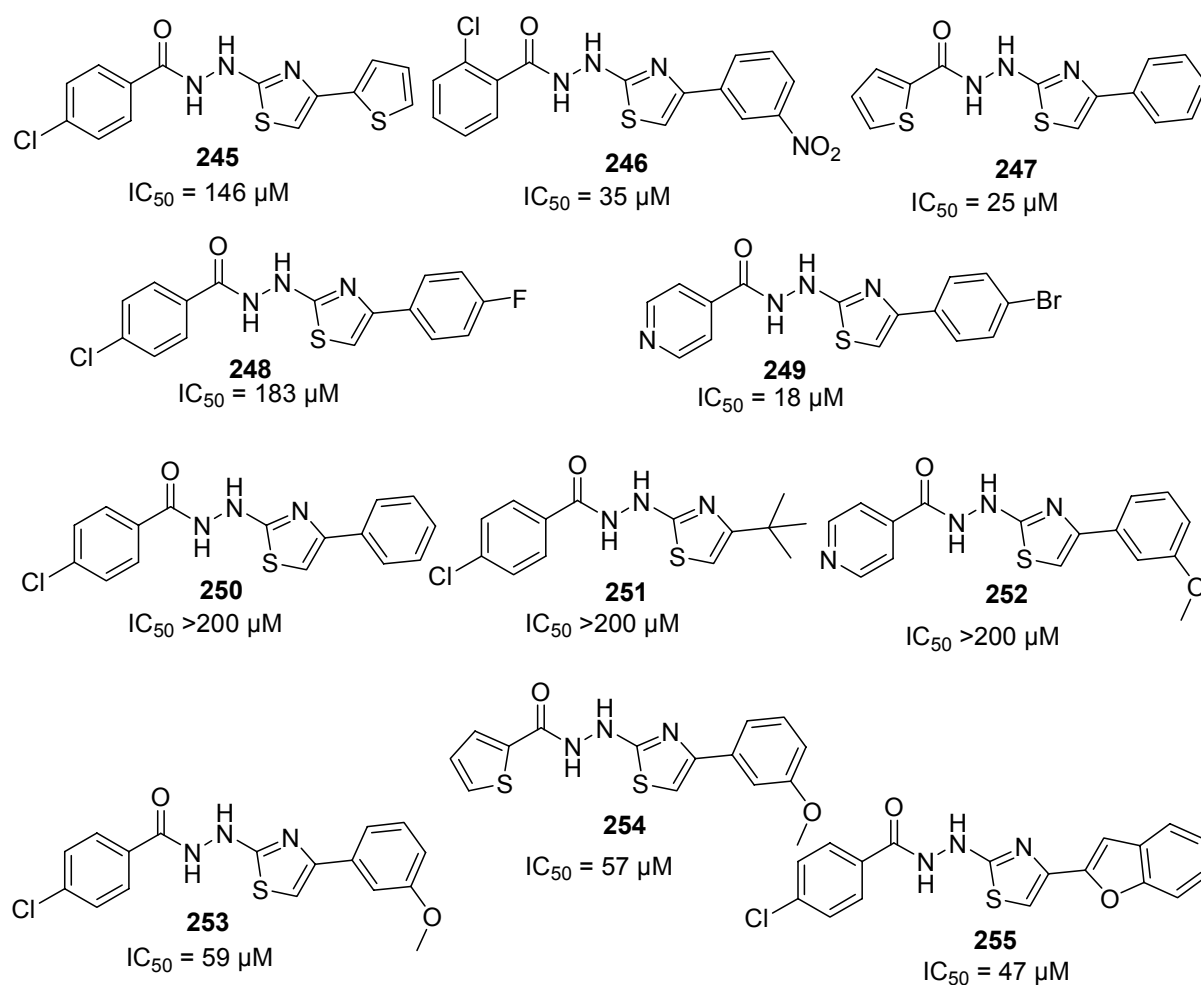


Abbildung 8.12. Strukturen und biologische Daten der Verbindungen **245-255** aus der 2. Generation.

Substanz	clogP	aqSol ^a	HIA ^b	BBB ^c	LDH [%] ^d	LDH dev. ± [%] ^e
226	2.77	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
227	6.84	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
228	2.62	gut	gut	BBB ⁻	-	-
229	3.48	gut	gut	BBB ⁺	-	-
230	3.47	gut	gut	BBB ⁺	-	-
231	3.47	gut	gut	BBB ⁺	-	-
232	4.17	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
233	6.22	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
234	4.10	gut	gut	BBB ⁺	-	-
235	4.60	gut	gut	BBB ⁻	47.4	1.5
236	4.91	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
237	2.60	gut	gut	BBB ⁺	-	-
238	4.52	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
239	5.95	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
240	4.92	gut	gut	BBB ⁺	-	-
241	4.55	gut	gut	BBB ⁺	-	-
242	6.01	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
243	5.53	schlecht	gut	BBB ⁺	-	-
244	3.45	gut	gut	BBB ⁺	-	-
245	3.94	gut	gut	BBB ⁻	3.8	4.4
246	4.60	gut	gut	BBB ⁻	43.0	3.6
247	3.42	-	-	-	14.8	1.7
248	4.78	gut	gut	BBB ⁻	56.1	11.9
249	4.07	-	-	-	1.5	4.1
250	4.64	-	-	-	34.2	4.9
251	4.59	gut	gut	BBB ^{+/-}	48.1	2.4
252	3.03	gut	gut	BBB ⁻	3.2	4.5
253	4.39	-	-	-	42.1	17.7
254	3.16	-	-	-	25.3	2.9
255	4.36	schlecht	gut	BBB ^{+/-}	-0.6	0.7

Tabelle 8.1. Berechnete ADME-Eigenschaften (Maybridge “*Screening Collection*“ Datenbank (Oktober 2004)) & Ergebnisse des LDH Assays. ^a aqSol (Löslichkeit in wässriger Lösung bei 1 μ M). ^b HIA (*Human intestinal absorption*: gut impliziert > 40% Absorption). ^c BBB (Blut-Hirn-Schranken-Aufteilung: BBB⁺ impliziert gute Hirn-Penetration, $\log [\text{Konz. im Blut}]/[\text{Konz. im Gehirn}] \geq -0,2$, BBB⁻ impliziert schlechte Hirn-Penetration, $\log [\text{Konz. im Blut}]/[\text{Konz. im Gehirn}] \leq -0,5$). ^d LDH: Ergebnis des Lactatdehydrogenase-Assays. Im LDH-Assay wird die Cytotoxizität von substratbehandelten Zellen photometrisch bei 500 nm durch die Reduzierung von NAD⁺ zu NADH+H⁺ und anschließender Konversion eines gelben Tetrazoliumsalzes zu Formazan (rot) bestimmt und relativ zu DMSO quantifiziert. ^e LDH dev.: Fehlerwerte des LDH-Assays.

9 Synthese von Tau-Aggregations- und Depolymerisations-Inhibitoren

9.1 Einleitung

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (siehe Kapitel 1.5) mit der in ihr beschriebenen Unausgewogenheit des A β -Stoffwechsels und der sich daraus ergebenden Aggregation des A β -Peptides wird heute von den meisten Wissenschaftlern als hauptsächliche Ursache des neuronalen Todes und der Dysfunktion von Nervenzellen, welche zur Alzheimer-Demenz führen, akzeptiert. Eine kleinere Gruppe von Alzheimerforschern betrachtet dagegen die Bildung der Neurofibrillären Bündel unter Einfluss des Proteins Tau als zentralen Prozess bei der Krankheitsentstehung. Die Trennung in diese zwei Lager geht soweit, dass die Anhänger der beiden Gruppen mit an Religionsgemeinschaften erinnernde Namen wie „Baptisten“ und „Tauisten“ bezeichnet werden.^[288]

„Tauisten“ stützen ihre Argumentation vor allem auf die Tatsache, dass eine Neurodegeneration auch in Bereichen des Hirns auftritt, die frei von Amyloiden Plaques sind. In den von Tau-Mutationen ausgelösten familiären Frontotemporalen Demenzen (FTDP-17) tritt der neuronale Tod nachweislich auch ohne die Anwesenheit von A β -Ablagerungen ein. Außerdem ereignen sich Phosphorylierung und Aggregation von Tau in Amygdala und Hippocampus, also in Hirnarealen, welche für Sprache und Gedächtnis verantwortlich gemacht werden und beide mit den Symptomen einer Alzheimer-Demenz korrelieren.^[289]

„Baptisten“ verweisen dagegen darauf, dass erhöhte A β -Levels in den Frontallappen nachweisbar sind, bevor auch nur die kleinsten Anzeichen einer Tau-Pathologie auftreten. In transgenen Mäusen, die sowohl APP als auch Tau überexprimieren, finden sich gleiche Mengen von A β -Ablagerungen wie in Tg2576-Mäusen jedoch können wesentlich höhere Mengen von Neurofibrillären Bündeln festgestellt werden als bei Mäusen, die lediglich das Tau-Protein überexprimieren. Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass sowohl APP als auch A β die Entstehung der Neurofibrillären Bündel beeinflussen.^[290]

Unabhängig davon, welche der beiden Theorien zur Erklärung der Entstehung von Alzheimer-Demenz verwendet wird, die Aggregation von Tau ist im Krankheitsverlauf nicht zu ignorieren. Substanzen, die diese Aggregation verhindern bzw. vorhandene Aggregate wieder auflösen, bieten die Möglichkeit die Pathologie der Krankheit positiv zu beeinflussen und sind deshalb von großem Interesse für eine Alzheimer-Wirkstoffentwicklung. Vor allem die Gruppe der Tauisten sieht im Verhindern der Aggregation von Tau eine Möglichkeit, die Nervenzellen vor dem Zerfall zu schützen. Pickhardt und Mitarbeiter konnten aus einer Substanzbibliothek von 200.000 Verbindungen 1266 Moleküle identifizieren, die eine Zusammenlagerung von Tau verhindern; 77 dieser Substanzen waren zusätzlich in der Lage, Tau-Filamente wieder aufzulösen.^[144] Außerdem konnte, wie in Kapitel 8 beschrieben, mittels eines ligandenbasierten virtuellen Screenings eine neue Leitstruktur identifiziert werden, die ebenfalls die Tau-Aggregation unterbindet und Tau-Aggregate depolymerisiert. Um die Wirkung dieser Substanzen im Alzheimer-Prozess zu überprüfen, müssen aussichtsreiche Verbindungen allerdings zum einen in ihrer Aktivität gesteigert werden, zum anderen müssen sie ein gutes pharmakologisches Profil besitzen. Hauptaugenmerk liegt innerhalb dieser Arbeit vor allem auf der chemischen Veränderung der Phenylthiazolbenzhydrazide (Beispiel: **235**), bei denen in ersten biologischen Tests teilweise gute Zellverträglichkeiten nachgewiesen werden konnten. Als zweite Leitstruktur wird Verbindung **256** ins Auge gefasst. Sie entstammt dem beschriebenen Screening von Pickhardt et al. und hat einen IC_{50} für die Aggregationshemmung von 2.0 μM und einen DC_{50} für die Depolymerisation von bestehenden Aggregaten von 3.0 μM .

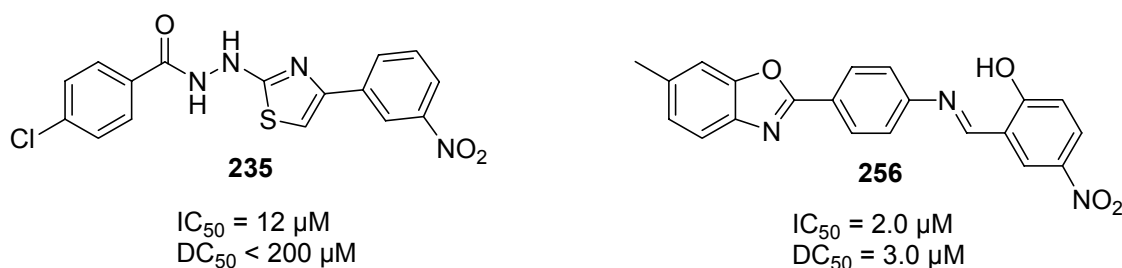
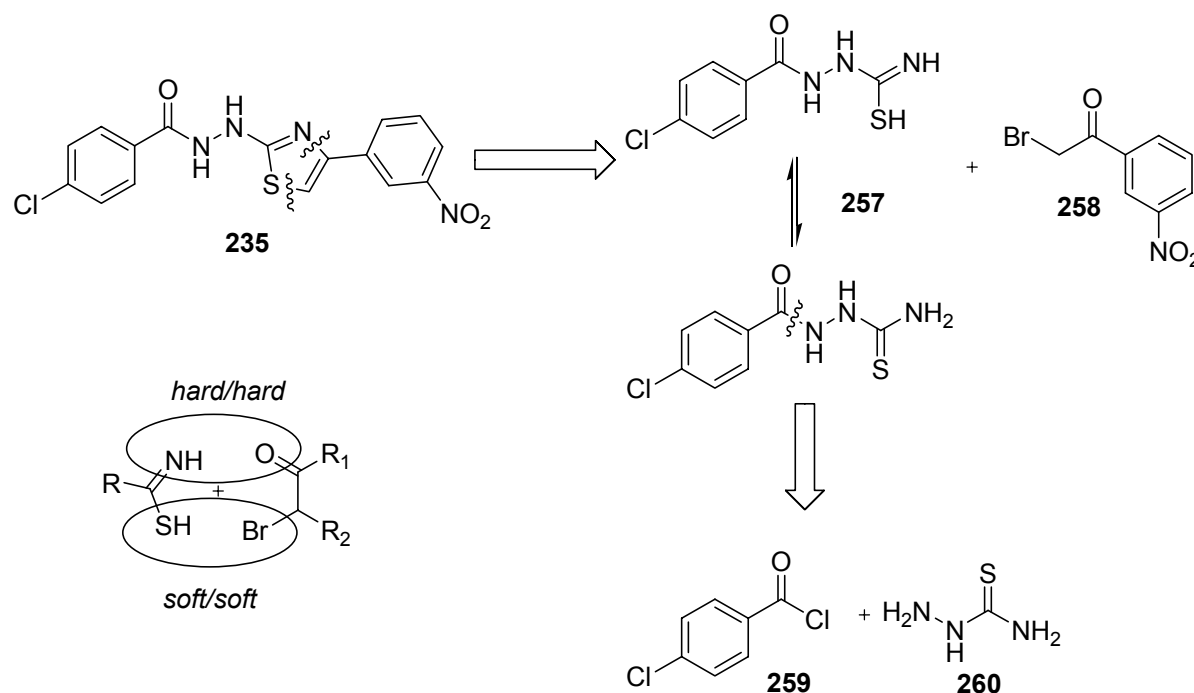


Abbildung 9.1. Strukturen der Tau-Aggregations-Inhibitor-Leitstrukturen.

9.2 Synthesepläne, allgemeine Überlegungen

Bei retrosynthetischer Betrachtung der Phenylthiazolbenzhydrazide erscheint es sinnvoll, den Thiazolring so zu zerlegen, dass er über eine Hantzsche Thiazolsynthese ausgehend von einem Bromacetophenonbaustein **258** und einem Semicarbazidderivat **257** aufgebaut werden kann. Die Reaktion ist besonders nützlich, da sie durch die *hard/hard*-Kombination von Stickstoff und Sauerstoff und die *soft/soft*-Beziehung von Schwefel und Brom mit der gewünschten Selektivität stattfindet.

Zahlreiche Bromacetophenon-Derivate sind kommerziell erhältlich, wodurch eine chemische Variation an dieser Stelle kein Problem darstellt. Das Thiosemicarbazid **257** sollte auf einfache Weise über eine Kondensationsreaktion von einem Carbonsäurederivat **258** mit Thiosemicarbazid **260** hergestellt werden können. Verschiedene Varianten sind hier im Prinzip denkbar, so dass die ganze chemische Vielfalt der Carbonsäuren als Startmaterialien zur Verfügung steht.



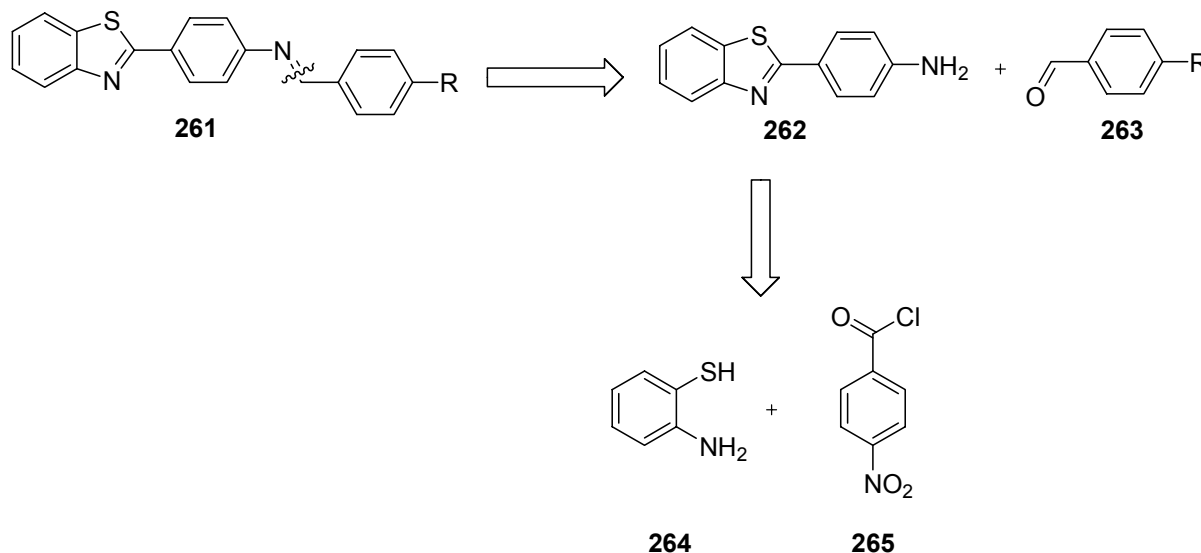
Schema 9.1. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **235**.

Wie bereits beschrieben wurde, konnte die Phenylthiazolbenzhydrazid-Leitstruktur durch ein virtuelles Screening identifiziert werden (siehe Kapitel 8). Um die Erkenntnisse der Tau-Aggregations-Inhibitoren nicht zu sehr von dem

pharmakophoren Modell abhängig zu machen, erscheint es sinnvoll, eine zweite Leitstruktur zu wählen, die nicht aus dem virtuellen Screening stammt.

Verbindung **256**, ein Imin eines Benzoxazols, zeigt *in vitro* eine Hemmung der Zusammenlagerung von Tau im mikromolaren Bereich. Bei der Synthese des Imins eröffnet sich außerdem durch die große Anzahl an kommerziell erhältlichen Aldehyden ein vielfältiger struktureller Variationsspielraum.

Im Gegensatz zu Benzoxazolen sollten Benzothiazole wesentlich einfacher bzw. mit wesentlich besseren Ausbeuten herzustellen sein, da es wie bei der Thiazolsynthese zu günstigen *hard/hard-soft/soft*-Kombinationen im Reaktionsverlauf kommt. Aus diesem Grund wurde die Struktur von **256** insoweit verändert, dass zunächst eine Reihe von Benzothiazolen synthetisiert werden sollten. Schema 9.2 zeigt einen möglichen Syntheseweg. Das Benzothiazol **262** ist über die Reaktion des Thiols **264** und des Säurechlorids **265** mit anschließender Reduktion der Nitrogruppe über zwei Stufen zugänglich. In einer abschließenden Kondensationsreaktion mit den verschiedensten Aldehyden sollten die gewünschten Benzothiazolprodukte erhalten werden können.

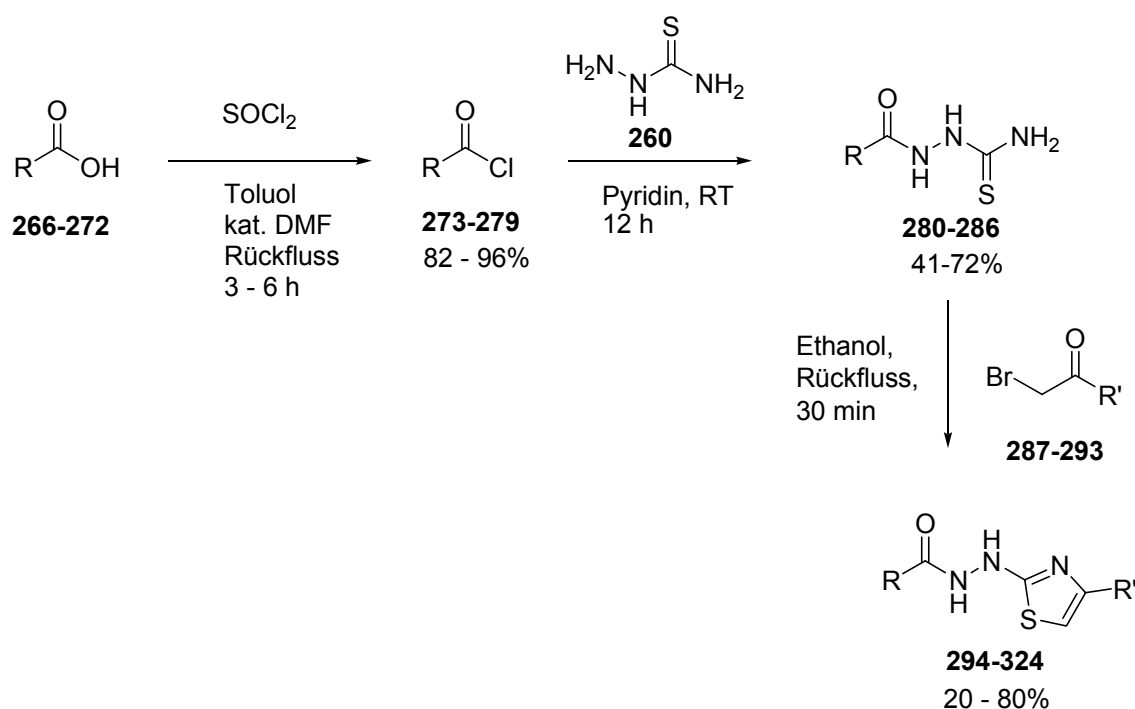


Schema 9.2. Retrosynthetische Betrachtung von Verbindung **261**.

9.3 Synthese

9.3.1 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide **294-324**

Zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide **294-324** wurden zunächst die kommerziell erhältlichen Carbonsäure-Derivate **266-272** mit Thionylchlorid und katalytischen Mengen DMF unter Standardbedingungen in sehr guten Ausbeuten in die entsprechenden Carbonsäurechloride **273-279** überführt und anschließend mit Thiosemicarbazid in Pyridin umgesetzt (Schema 9.3).



Schema 9.3. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide **294-324**.

Über eine Hantzsch Thiazolsynthese konnten die entsprechenden Thioamide **280-286** mit den Bromacetophenonen **287-293** in die Phenylthiazolbenzhydrazide **294-324** überführt werden. Die Rohprodukte liegen zunächst als Hydrobromide vor, diese werden allerdings in die entsprechenden salzfreien Verbindungen überführt, wobei es durch die z. T. schlechte Löslichkeit der Substanzen zu geringeren Ausbeuten kommen kann.

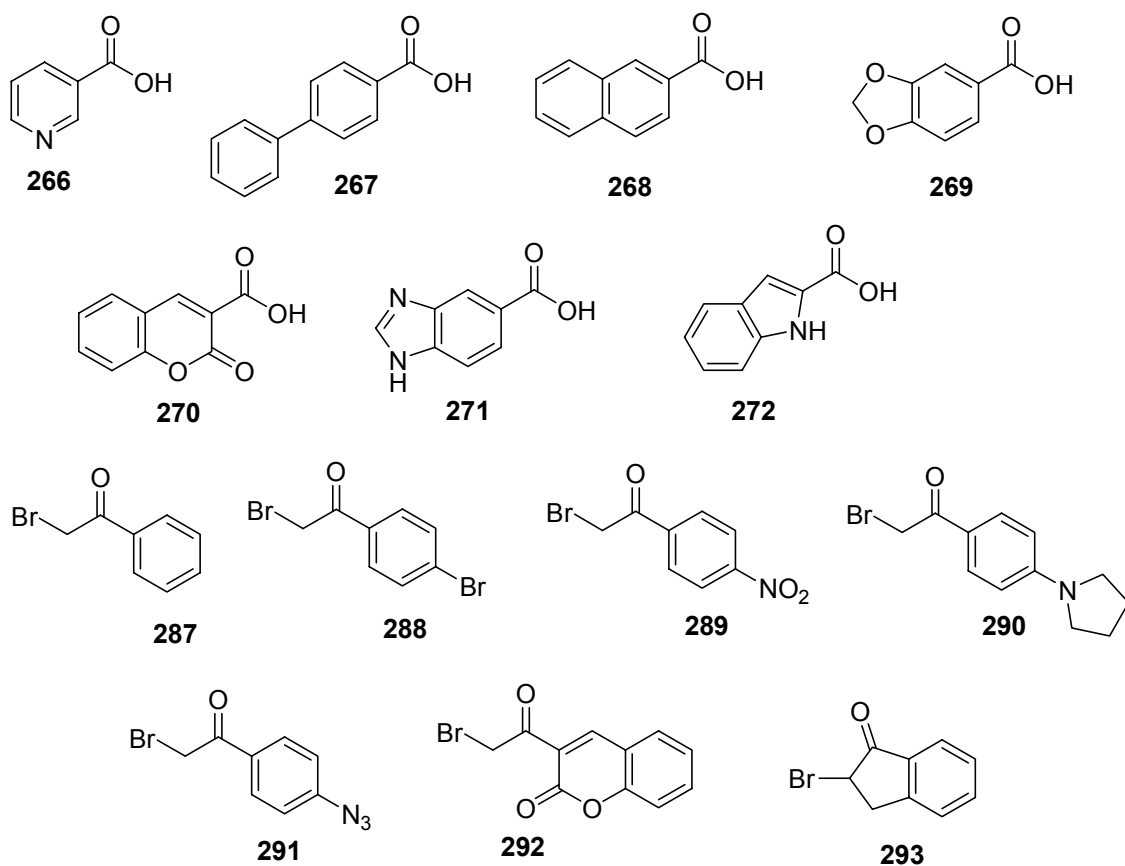


Abbildung 9.2. Strukturen der Carbonsäurederivate **266-272** und Bromoacetophenone **287-293**.

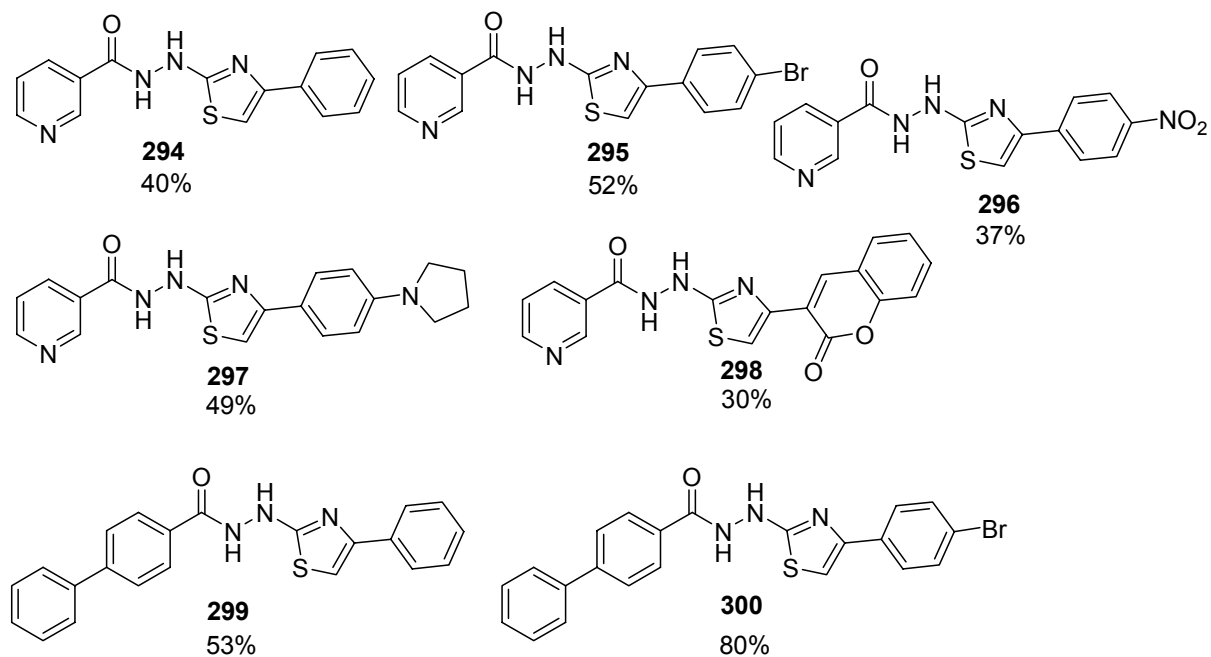


Abbildung 9.3. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide **294-300** mit den entsprechenden Ausbeuten.

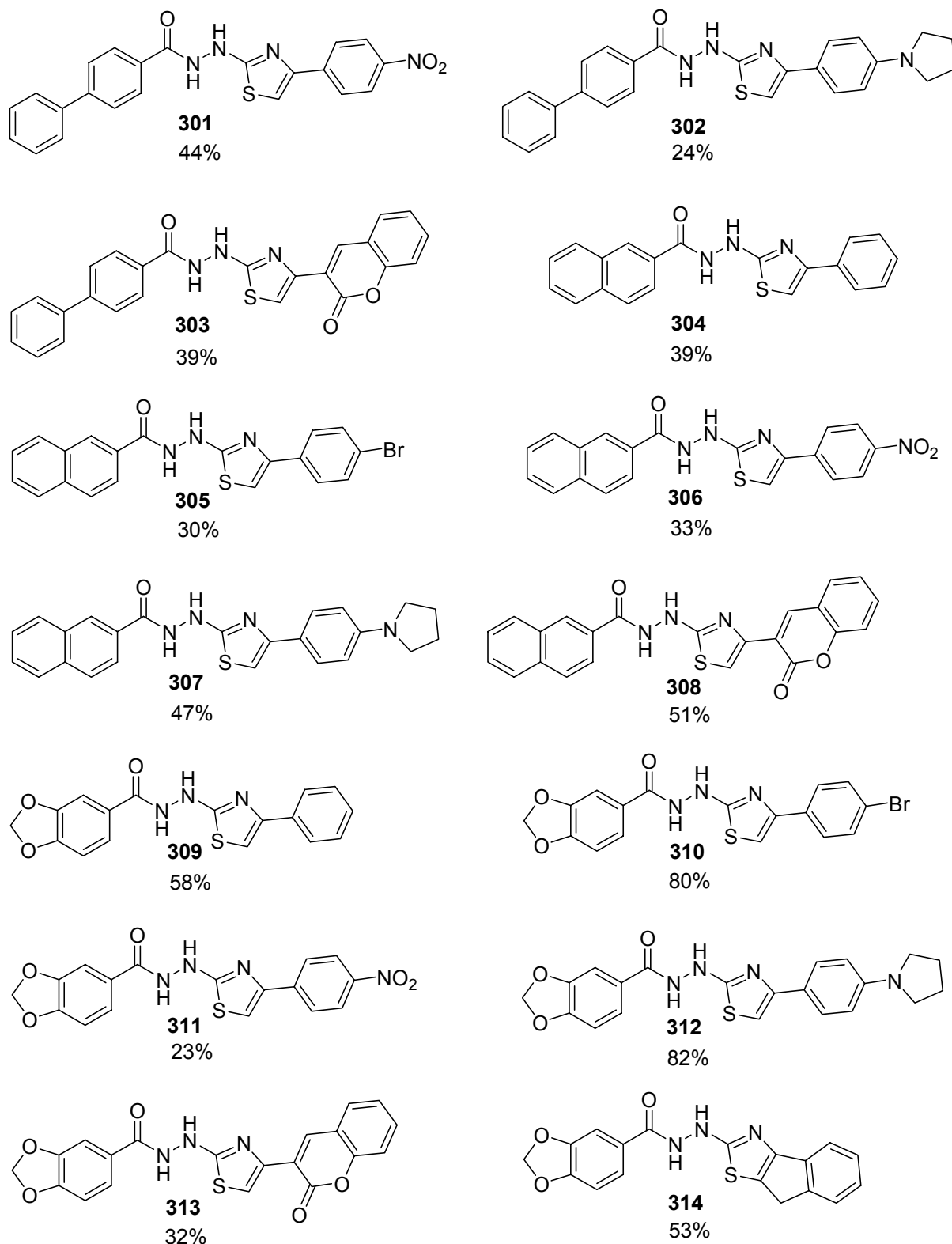


Abbildung 9.4. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide **301-314** mit den entsprechenden Ausbeuten.

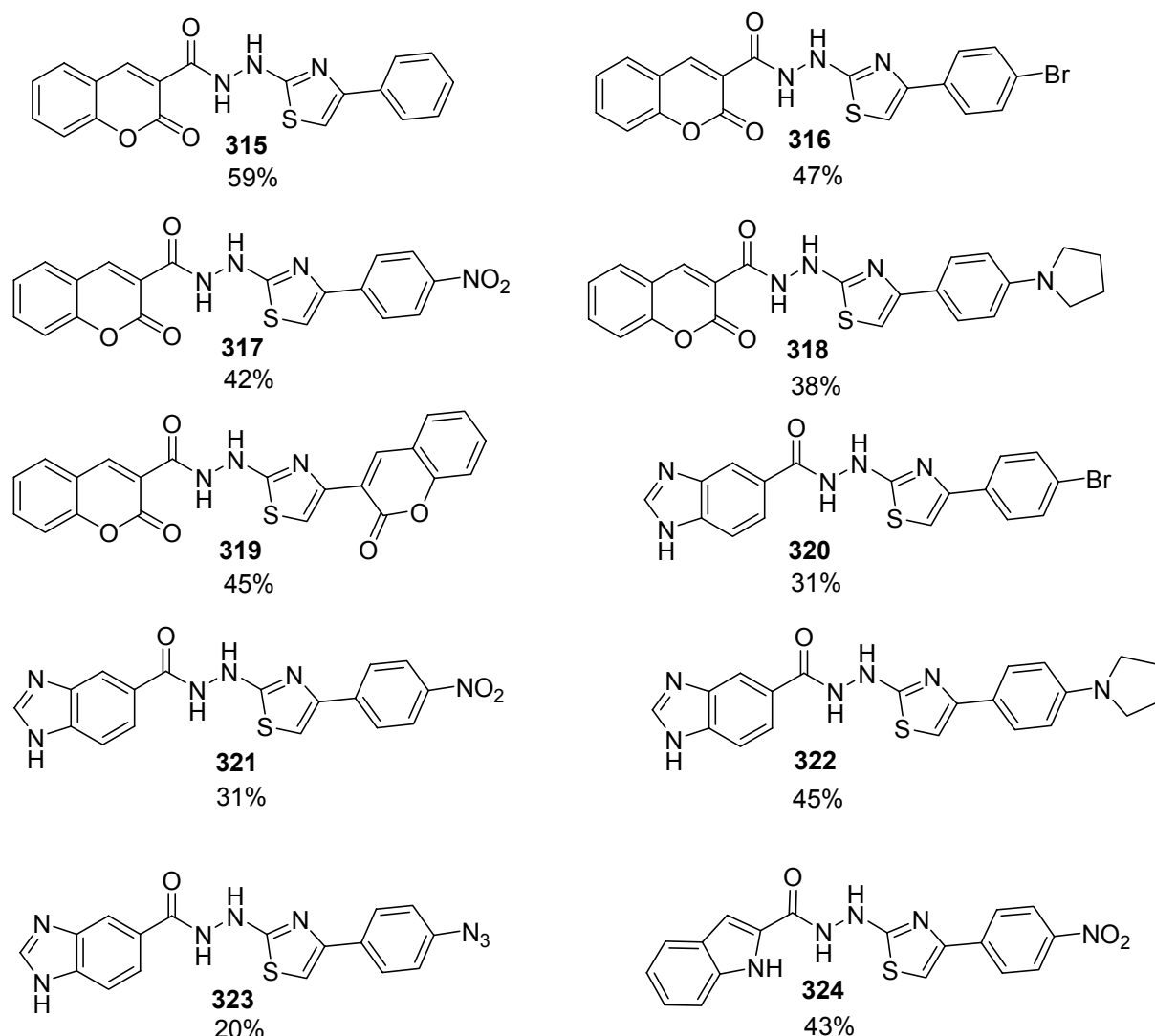
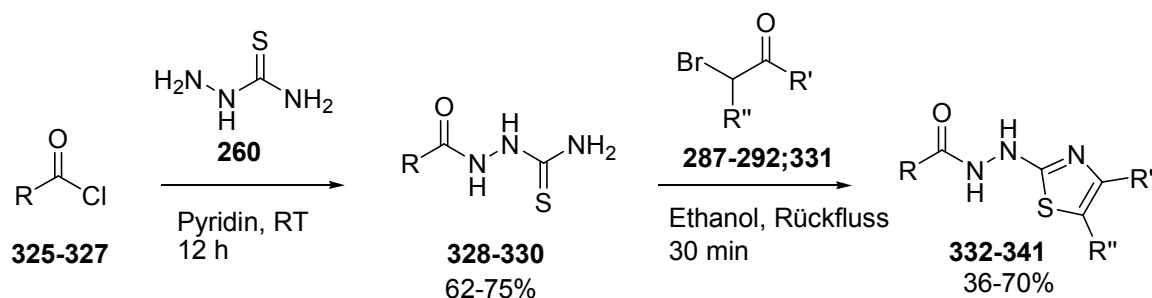


Abbildung 9.5. Strukturen der Phenylthiazolbenzhydrazide **315-324** mit den entsprechenden Ausbeuten.

9.3.2 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide **332-341**

Einziger Unterschied zwischen der Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide **332-341** (Schema 9.4) und der Synthese der Verbindungen **294-324** (Schema 9.3) ist die Wahl der Startmaterialien. Statt Carbonsäuren werden nun Carbonsäurechloride eingesetzt, womit sich der Syntheseweg um eine Stufe verkürzt. Da allerdings einige interessante Struktur motive nur als Carbonsäuren kommerziell angeboten werden bzw. viele der entsprechenden Carbonsäurechloride im Vergleich zu den entsprechenden Carbonsäuren erheblich teurer sind, ist der erste Reaktionsschritt wie er im vorigen Kapitel beschrieben wurde, teilweise unumgänglich.



Schema 9.4. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide **332-341**.

Die Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide **332-342** gelingt letztendlich, indem die aus der Reaktion der Carbonsäurechloride **325-327** mit Thiosemicarbazid **260** entstehenden Thioamide **328-330** in einer Hantzschschen Thiazolsynthese mit den Bromacetophenonen **278-284** und **331** umgesetzt werden.

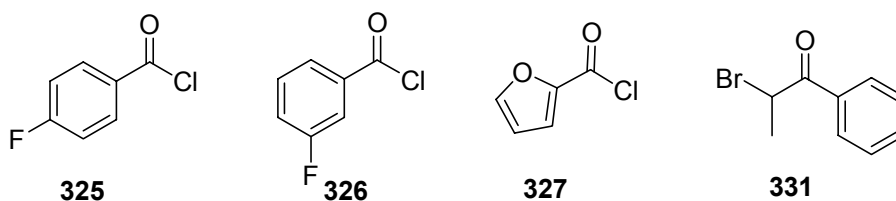


Abbildung 9.6. Strukturen der Carbonsäurechloride **325-327** und des Bromacetophenons **331**.

9.3.3 Synthese der Substanzen 346/347

In der Wirkstoffentwicklung werden oft nach dem Auffinden einer Leitstruktur heteroatomare Reste, cyclische Strukturen oder funktionelle Gruppen als Bioisostere eingeführt bzw. ausgetauscht. Sinngemäß übersetzt bedeutet Bioisosterie: gleiche räumliche Ausdehnung bei vergleichbarer Wirkung in biologischen Systemen. Oft liefert der Ersatz einer Substruktur eines komplexen Arzneistoffes ein anderes Wirkstoffprofil oder es werden andere metabolische Wege eingeschlagen, die unter Umständen zu weniger toxischen Abbauprodukten führen. In manchen Fällen ist es aber auch nur der Fall, dass eine höhere Variation von funktionellen Gruppen durch den Austausch gegen eine Bioisosteresubstruktur ermöglicht wird. Dies führt im Optimalfall zu einer Verbesserung der Affinität und möglicherweise der Selektivität eines Wirkmoleküls an einer molekularen physiologischen Struktureinheit. In anderen Fällen ist es auch nötig, die physikochemischen Parameter einer Verbindung zu optimieren. Diese können Polarität, Elektronendichteverteilung, Dynamik und die Löslichkeit betreffen.

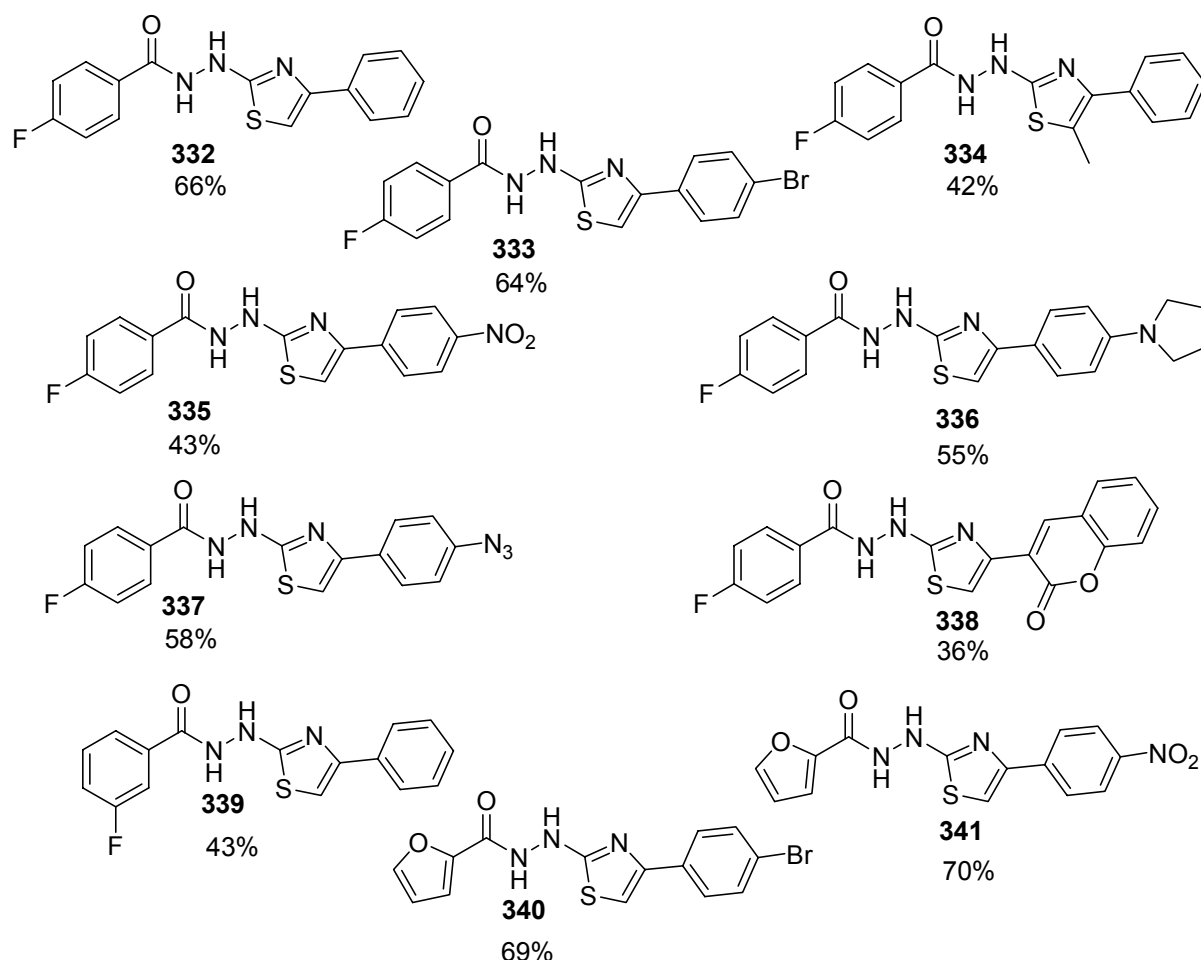
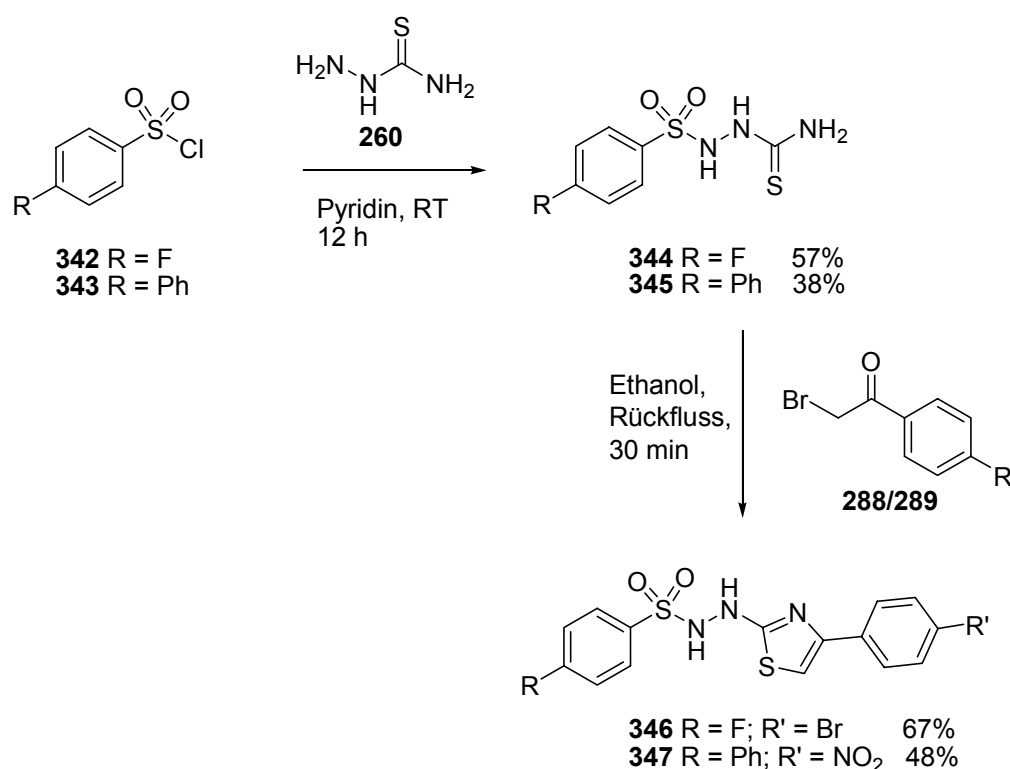


Abbildung 9.7. Phenylthiazolbenzhydrazide **332-341** und Ausbeuten.

In den Reaktionen der beiden vorigen Kapitel wurden bislang lediglich die Substituenten der Startmaterialien verändert. Die daraus resultierende strukturelle Variation soll vor allem die Erkenntnisse der Beziehung zwischen Struktur und Aktivität verbessern und bestenfalls Verbindungen liefern, die eine gesteigerte biologische Aktivität besitzen. Die in diesem Kapitel beschriebene Synthese der Substanzen **346** und **347** basiert stattdessen auf dem Hintergrund der Bioisosterie. Durch Austausch der Carbonylgruppe durch eine Sulfonfunktion wird vor allem die strukturelle Vielfalt erhöht und möglicherweise Verbindungen generiert, die bei gleich bleibender oder höherer Aktivität ein besseres pharmakologisches Profil besitzen. Die Sulfongruppe gilt als nicht-klassisches Bioisoster zu Carbonylfunktionen, d. h. sie besitzt nicht die gleiche Anzahl an Atomen und folgt nicht den strikten sterischen und elektronischen Definitionen der klassischen Isostere, trotzdem übernehmen sie gleiche biologische Funktionen.

Anstelle der Verwendung von Carbonsäuren oder Carbonsäurechloriden als Startmaterialien werden die beiden Sulfonylchloride **342** und **343** eingesetzt. In einer Reaktion mit dem Thiosemicarbazid **260** in Pyridin werden sie zu den entsprechenden Thioamiden **344** und **345** in moderaten Ausbeuten umgesetzt. Eine abschließende Thiazolbildung mit den Bromacetophenonen **288** und **289** liefert die Produkte **346** und **347** in moderater bis guter Ausbeute.

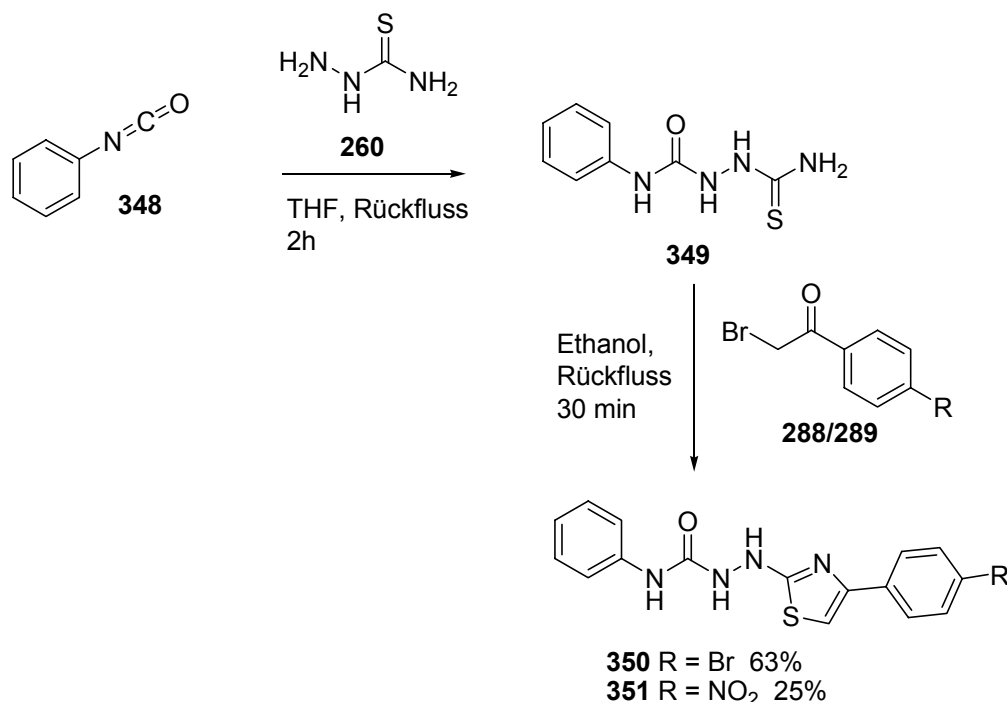


Schema 9.5. Synthese der Substanzen **346/347**.

9.3.4 Synthese der Substanzen **350/351**

Eine weitere Veränderung der Grundstruktur wird mit der Synthese der Verbindungen **350** und **351** erzeugt. Durch Aufbau der Harnstoffderivate verändert sich der Abstand des Wasserstoffbrücken-Akzeptors zu dem aromatischen Rest. Welchen Einfluss diese Änderung auf die biologische Aktivität hat, gilt es zu untersuchen.

Im ersten Schritt der Synthese wird Phenylisocyanat **348** in THF mit Thiosemicarbazid **260** in guten Ausbeuten umgesetzt. Das entstandene Thioamid **349** reagiert wiederum unter den bekannten Bedingungen zu den entsprechenden Harnstoff-Thiazolen **350** und **351**.



Schema 9.6. Synthese der Substanzen **350/351**.

9.3.5 Synthese der Substanzen **357/358**

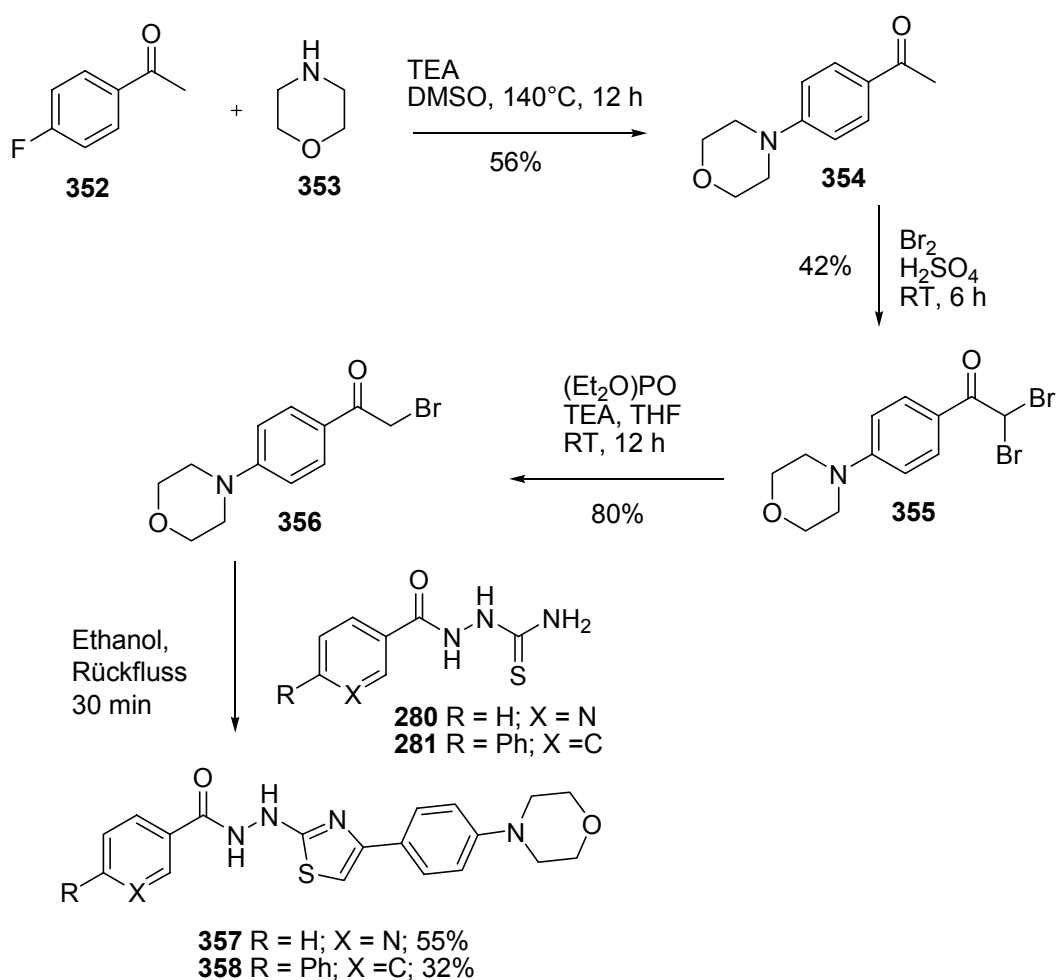
Erste biologische Tests deuten darauf hin, dass vor allem diejenigen Verbindungen gute Aktivitäten besitzen, welche aus Bromacetophenonen mit Nitro- bzw. Pyrrolidinsubstituenten aufgebaut sind. Es erscheint deshalb sinnvoll, weitere Bromacetophenone für die Synthese zu verwenden, die ebenfalls Aminsubstituenten beinhalten.

Als möglicher Syntheseweg kommt eine Reaktion eines fluorsubstituierten Arylmethylketons mit einem sekundären Amin nach einem Addition-Eliminierungs-Mechanismus und anschließender Bromierung in Frage. Von größerer Schwierigkeit scheint dabei allerdings die Selektivität der Bromierung zu sein, da sie in der Regel komplexe Gemische von verschiedenen Produkten, resultierend aus Ringsubstitution, Radikalreaktion oder von Addition an die Enolform der Carbonylfunktion, ergeben kann.^[291] Zusätzlich wird eine selektive Bromierung der Seitenkette im Fall der aminsubstituierten Arylmethylketone durch den elektronenschiebenden Effekt der Amingruppe erschwert, welcher eine Ringbromierung begünstigt.

In einer Publikation von Diwu et al. wurden verschiedene Bedingungen und Reagenzien für Bromierungen von aminsubstituierten Arylmethylketonen untersucht,

wobei letztendlich eine zweistufige Bromierungs-, Debromierungsmethode die besten Resultate liefert.^[292]

Zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide **357** und **358** wurden zunächst das Arylmethylketon **352** und Morpholin **353** in DMSO und Triethylamin zum entsprechenden Arylmethylketon **354** in 56% Ausbeute umgesetzt. Eine anschließende Bromierung in konzentrierter Schwefelsäure lieferte die Dibromverbindung **355**. Die in der Literaturvorschrift erzielte quantitative Umsetzung konnte allerdings aus ungeklärten Gründen in keiner der Durchführungen erreicht werden. Das Bromacetophenon **356**, welches aus der Debromierung von **355** mit Diethylphosphit und Triethylamin in guten Ausbeuten erhalten werden konnte, wurde in einer abschließenden Thiazolsynthese mit den Thioamiden **280** und **281** zu den beiden gewünschten Phenylthiazolbenzhydraziden **357** und **358** umgesetzt.

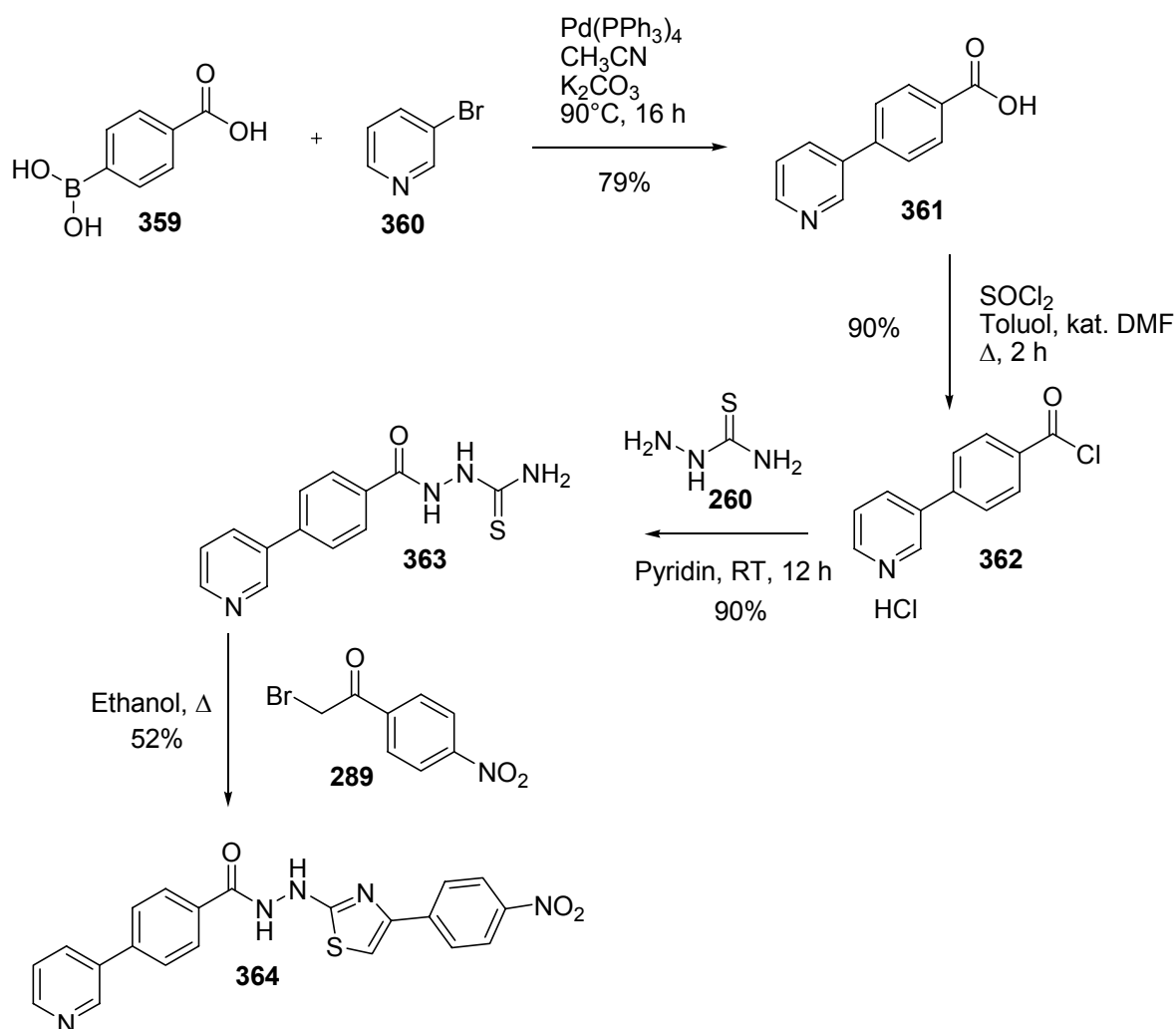


Schema 9.7. Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide **357-358**.

9.3.6 Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides **364**

Neben der im vorigen Kapitel bereits beschriebenen Wahl bestimmter Bromacetophenone zur Synthese potenter Verbindungen können außerdem Biphenyl- oder Pyridinmotive in den Substanzen mit den höchsten Aktivitäten identifiziert werden. Es scheint deshalb sinnvoll, diese beiden Strukturfragmente zu verbinden, um gegebenenfalls die Aktivität zu steigern.

Zur Synthese einer solchen Verbindung wurde zunächst durch Suzuki-Kupplung von 4-Carboxyphenylboronsäure **359** und 3-Brompyridin **360** unter Standardbedingungen die Carbonsäure **361** mit 79% Ausbeute hergestellt. Nach anschließender Umwandlung in das entsprechende Carbonsäurechlorid **362** und Kupplung mit dem Thiosemicarbazid **260** zum Thioamid **363** konnte das Phenylthiazolbenzhydrazid **364** über eine Hantzsche Thiazolsynthese mit dem Bromacetophenon **289** mit 52% Ausbeute erhalten werden.

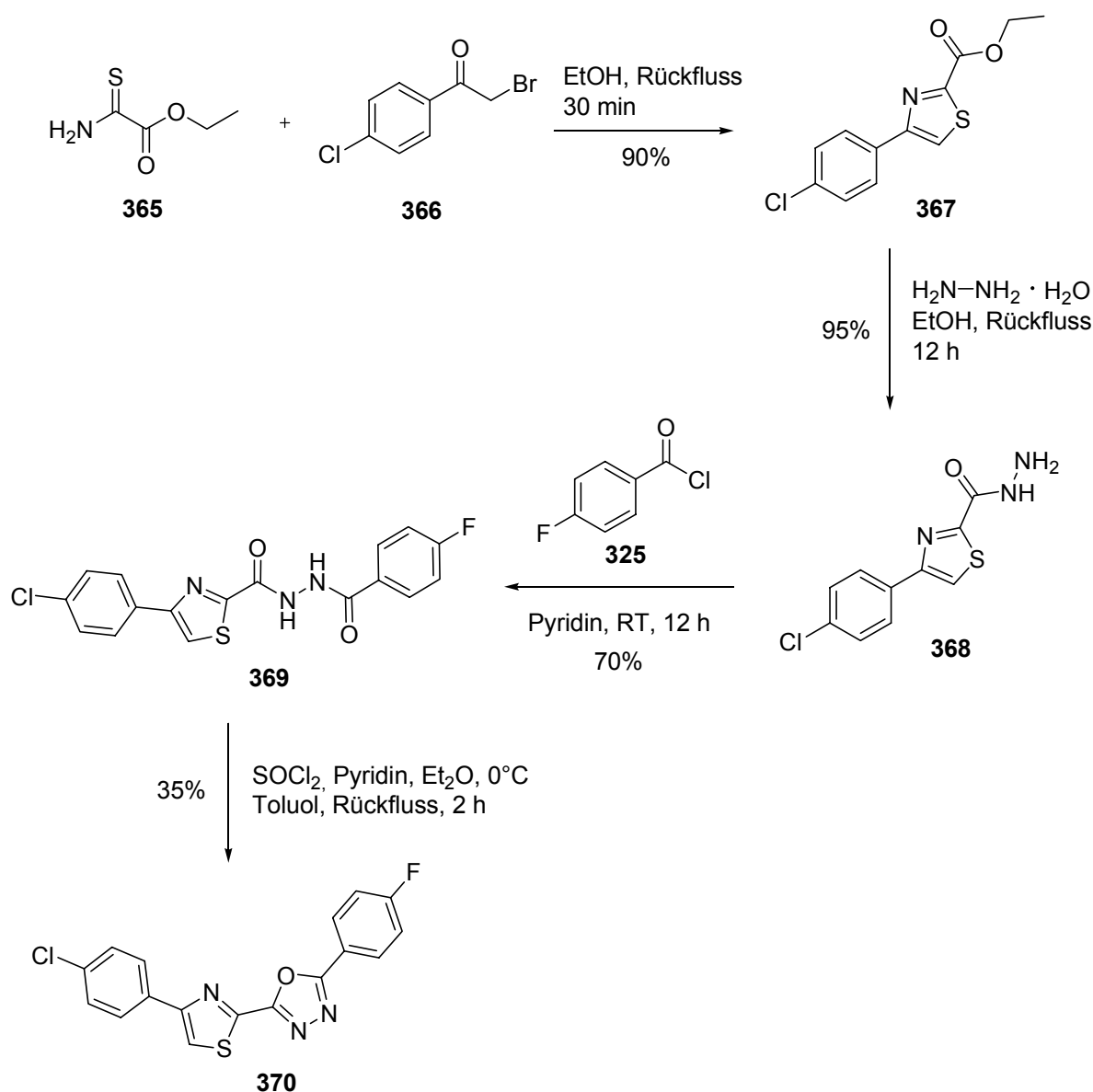


Schema 9.8. Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides **364**.

9.3.7 Synthese der Verbindung 370

Ein beliebtes Prinzip im Wirkstoffdesign zielt darauf ab, konformativ fixierte Liganden einzusetzen. Neben der dadurch gesteigerten Selektivität dieser Verbindungen wird oft eine erhöhte Affinität zu einem Rezeptor erreicht, da der Entropieverlust bei der Bindung in solchen Fällen kleiner ist als bei der Bindung eines flexiblen Liganden.

Basierend auf diesem Konzept erfolgte die Herstellung von Substanz **370** (Schema 9.9), bei der das Hydrazid-Motiv der Leitstruktur in einem Oxadiazolring „eingefroren“ werden sollte. Von größerem Interesse bei diesem Synthesepfad ist außerdem das Vorläufermolekül **369**, welches einen zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Akzeptor besitzt, und deshalb ebenfalls neue Erkenntnisse für die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen liefern kann.



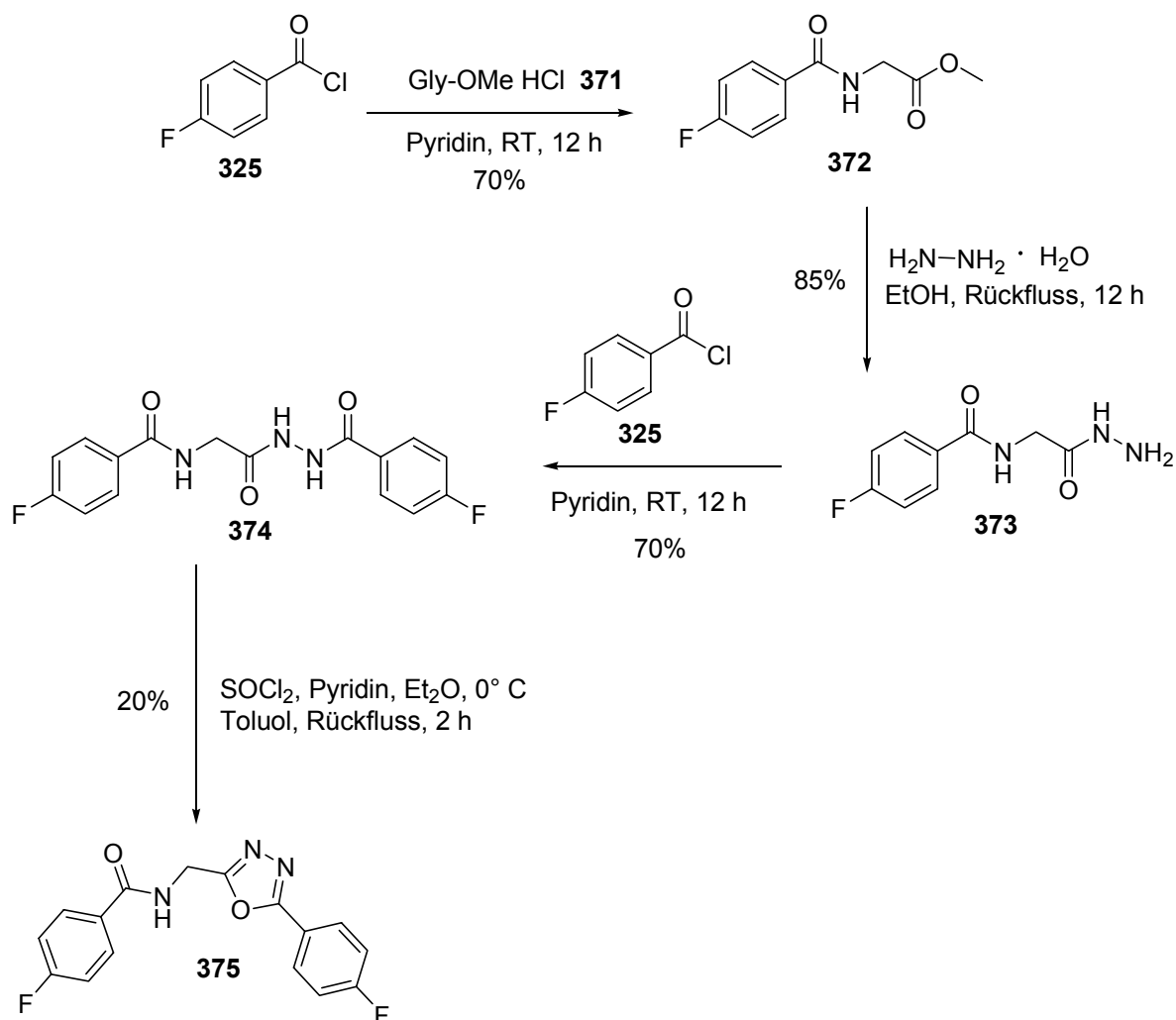
Schema 9.9. Synthese der Verbindung **370**.

Die Synthese erfolgt ausgehend von dem Thioxamidsäureethylester **365** und dem Bromacetophenon **366**, welche in einem ersten Schritt zu dem entsprechenden Thiazol **367** in sehr guten Ausbeuten reagieren. Durch Umsetzung mit Hydrazinhydrat und anschließender Schotten-Baumann-Reaktion mit dem Carbonsäurechlorid **325** wurde Verbindung **369** in 70% Ausbeute erhalten. Die abschließende Cyklisierung zum Oxadiazol **370** konnte mit Thionylchlorid in allerdings schlechten Ausbeuten erreicht werden.

9.3.8 Synthese der Verbindung 375

Eine bedeutende Funktion für die Aktivität der Leitstruktur scheint der zentrale Thiazolring zu übernehmen. Wie weitreichend diese Bedeutung ist, kann untersucht werden, indem der Thiazolring durch andere fünfgliedrige Heteroaromaten ersetzt wird. Wie verhält sich beispielsweise die Aktivität, wenn der Thiazolring durch ein entsprechendes Oxazol ausgetauscht wird? Das Schwefelatom ist sehr viel größer als Sauerstoff und weniger elektronegativer, was zur Folge hat, dass entsprechende Wasserstoffbrücken des Sauerstoffs stärker sein müssten als die des Schwefels. Es scheint also durchaus denkbar, dass durch einen solchen Austausch die Aktivität gesteigert werden könnte.

Da eine Oxazolsynthese durch fehlende *hard/hard-soft/soft*-Kombinationen möglicher Edukte wie Harnstoff und Bromacetophenone nicht auf vergleichbar einfache Art wie die entsprechenden Thiazole durchgeführt werden kann, wird zunächst eine Alternativsynthese mit einem Oxadiazol als Heterocyclus ausgearbeitet (Schema 9.10). Eine Schotten-Baumann-Reaktion von Glycinmethylester **371** und dem Carbonsäurechlorid **325** lieferte zunächst in 70%iger Ausbeute das Amid **372**. Dieses wurde durch Reaktion mit Hydrazinhydrat und einer erneuten Schotten-Baumann-Reaktion mit dem Carbonsäurechlorid **325** in guten Ausbeuten zur Substanz **374** umgesetzt. Eine abschließende Cyklisierung mit Thionylchlorid lieferte das gewünschte Oxadiazol **375** in allerdings geringen Ausbeuten.



Schema 9.10. Synthese der Verbindung **375**.

9.3.9 Synthese der Benzothiazole **387-393**

Zur Herstellung von 2-Arylbenzothiazolen wurden in der Literatur bislang verschiedenste Methoden beschrieben. Üblicherweise wurde ein *ortho*-Aminothiophenol-Baustein mit aromatischen Aldehyden,^[293] Carbonsäuren,^[294] Säurechloriden^[295] oder Nitrilen^[296] umgesetzt. Einige dieser Methoden benötigen allerdings ziemlich drastische Bedingungen, wie z.B. die Kondensation mit Carbonsäuren in Polyphosphorsäure bei hohen Temperaturen.^[294] Nichtsdestotrotz existieren auch weitaus mildere Methoden, wie die oxidative Cyclisierung von Thiobenzaniliden unter Verwendung von alkalischem Kaliumhexacyanoferrat.^[297]

Bei der Herstellung der Benzothiazole **387-393** wurde eine Methode von Brembilla et al. angewendet.^[295] Ausgehend von *ortho*-Aminothiophenol **376**, dem

Carbonsäurechlorid **377** und NMP als Lösungsmittel, welches dabei das gebildete HCl abfängt, konnte das Benzothiazol **378** in sehr guten Ausbeuten hergestellt werden.

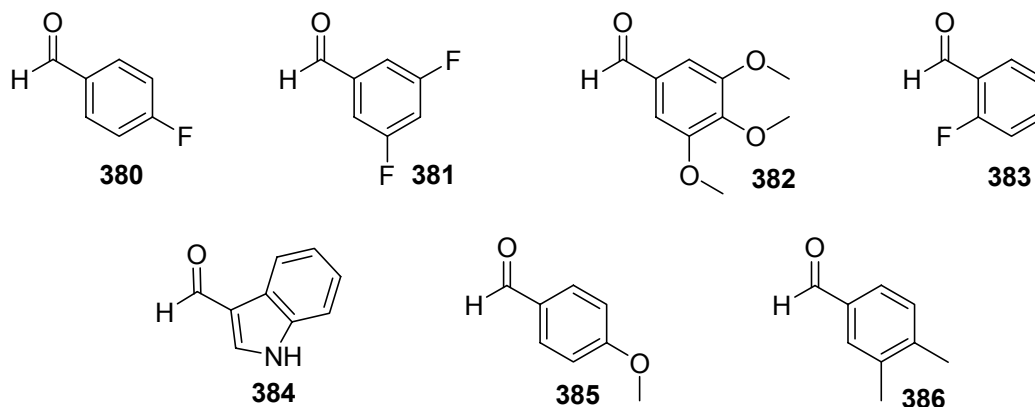
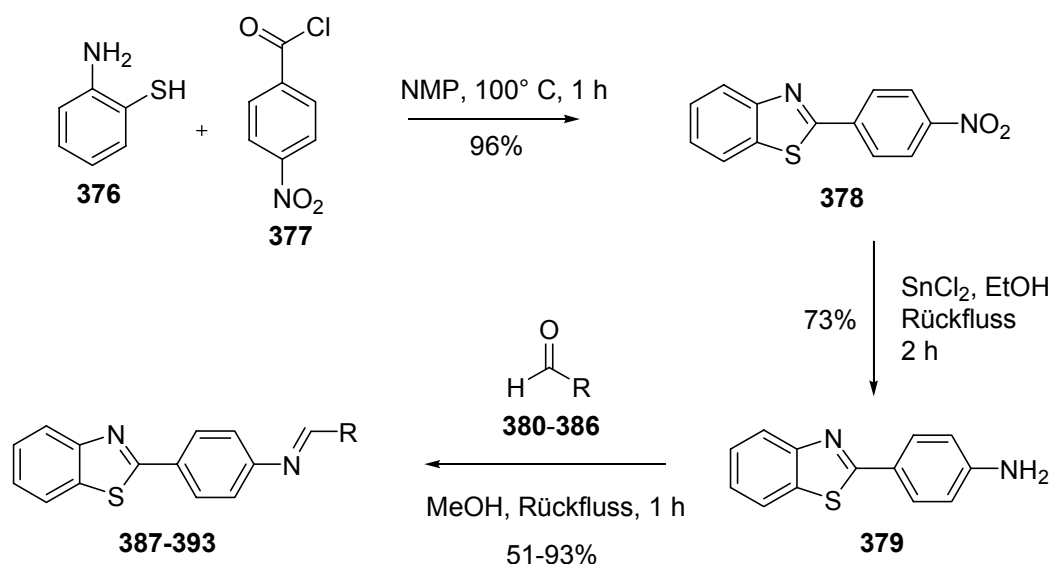


Abbildung 9.8. Strukturen der Aldehyde **380-386**.

Die Nitrogruppe wurde anschließend unter Verwendung von Zinnchlorid in refluxierendem Ethanol unter Bildung des Anilin-Derivats **379** reduziert. Die gewünschten Imine **387-393** konnten über eine abschließende Kondensation von **379** mit den entsprechenden Aldehyden **380-386** in moderaten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden.



Schema 9.11. Synthese der Verbindungen **387-393**.

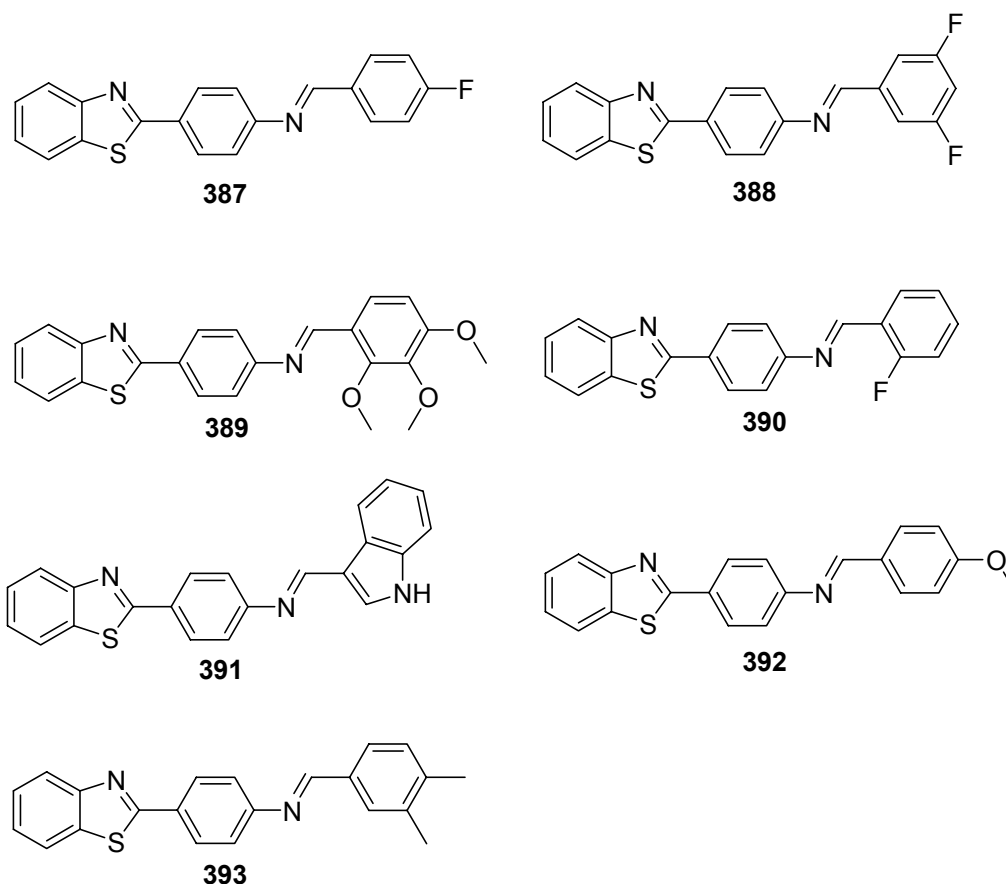


Abbildung 9.9. Strukturen der Benzothiazole 387-393.

9.4 Biologische Aktivität

9.4.1 Aktivitäten der Phenylthiazolhydrazid-Derivate

Die Bestimmung der biologischen Aktivität der hergestellten Verbindungen wurde mittels eines in Kapitel 8 bereits erwähnten Thioflavin-S-Fluoreszenz-Assays durchgeführt.^[132]

Lange Zeit bestanden große Schwierigkeiten die Tau-Aggregation *in vitro* zu simulieren. Mit der Entdeckung zahlreicher Faktoren, die eine Tau-Zusammenlagerung positiv beeinflussen, konnten diese Probleme allerdings behoben werden. Die *repeat*-Domäne von Tau bildet beispielsweise leichter PHFs als *full-length isoforms* von Tau.^[130] Außerdem gelingt die Zusammenlagerung schneller, wenn Proteinuntereinheiten bereits oxidativ als Dimere über Disulfidbrücken verknüpft sind,^[131] oder wenn Polyanionen zugegeben werden.^[83,134,135]

Zur Quantifizierung der Aktivität die Tau-Aggregation zu hemmen bzw. Tau-Aggregate wieder aufzulösen, kann die ThS-Fluoreszenz ausgenutzt werden. Dabei ist die Höhe der Emission bei 480 nm proportional zum Gehalt der PHFs. Das Ausmaß der Inhibition (%) wird gegen die Inhibitorkonzentration (1 pM - 200 μ M), wie in Abbildung 9.11 als Beispiel gezeigt, aufgetragen. Bei der Untersuchung der Depolymerisationseigenschaft der Substanzen wird zunächst aus 10 μ M Tau K19 PHFs gebildet, welche dann ebenfalls mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 pM - 200 μ M) des Inhibitors versetzt und graphisch aufgearbeitet werden (Abb. 9.11).

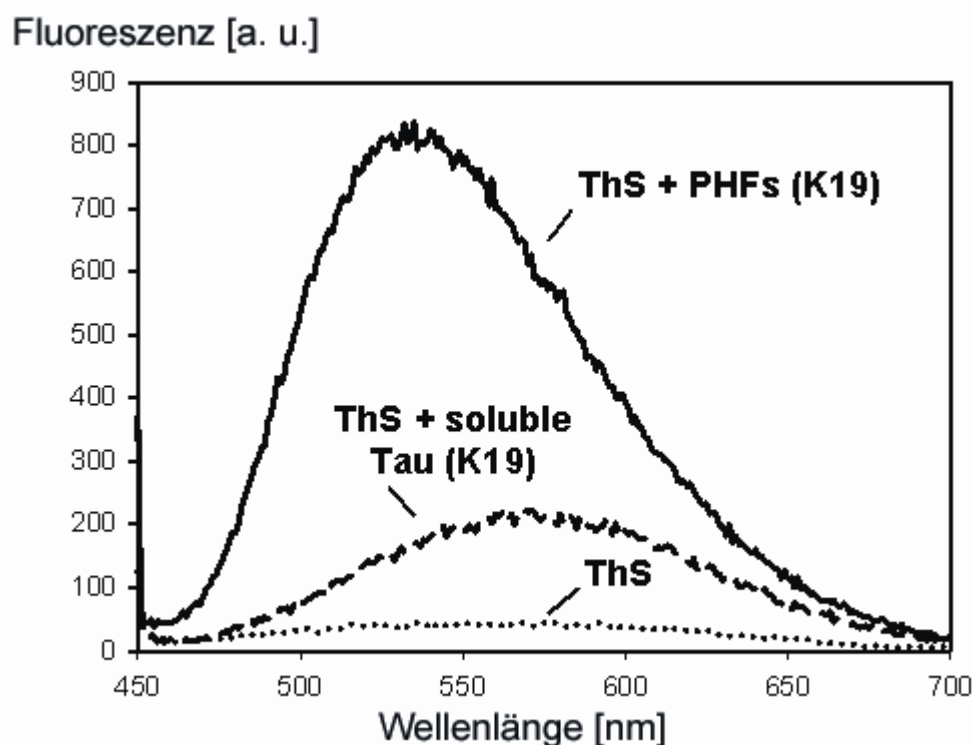


Abbildung 9.10. Veränderung der spektralen Eigenschaften von Thioflavin-S während der Aggregation von Tau. Die ThS-Fluoreszenz kann verwendet werden, um die Aggregation von Tau in *paired helical filaments* (PHFs) zu messen. a.u. = arbitrary unit. Das Maximum der ThS-Fluoreszenz bei 521 nm wird dabei um ein Vielfaches erhöht und ist proportional zu dem Maße der PHF-Aggregation (ThS (60 μ M), ThS (60 μ M plus lösliches (soluble) Tau-Protein (K19, 10 μ M): ThS (60 μ M) plus PHFs (10 μ M)). Jede Probe hat eine Konzentration von 2% in DMSO und wird vor der Messung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

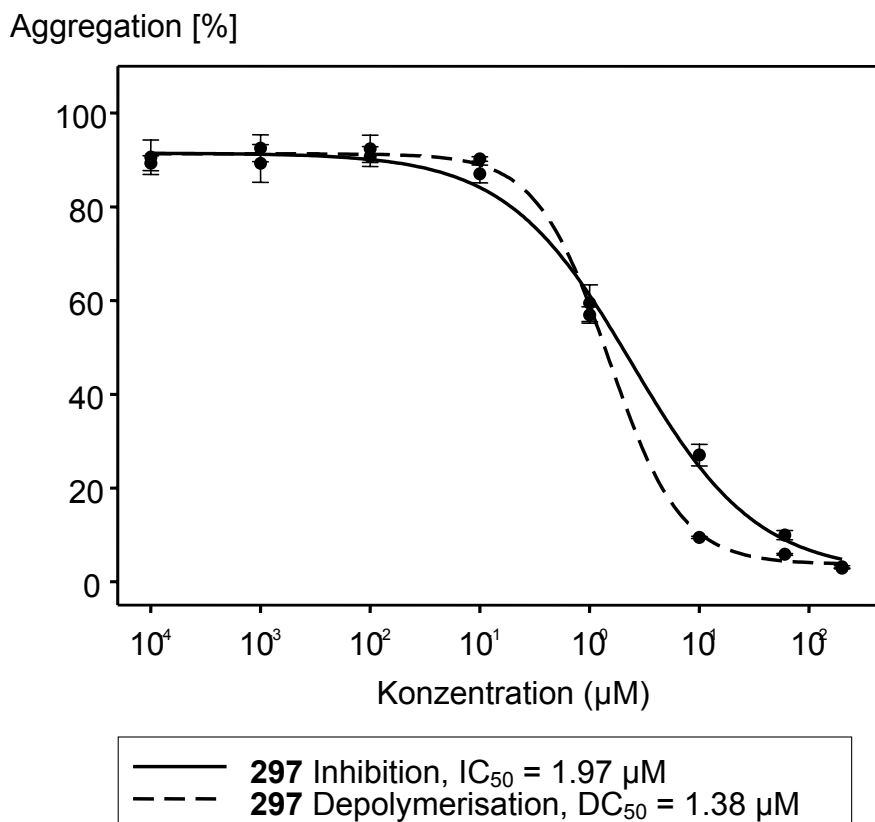


Abbildung 9.11. Beispiel für eine graphische Auswertung der Tau-Aggregations- und Tau-Depolymerisations-Inhibition.

In Tabelle 9.1 sind die IC_{50} -Werte der Hemmung der Tau-Aggregation bzw. die DC_{50} -Werte, zur Aktivität Tau-Aggregate wieder aufzulösen, zusammengefasst. In einigen Fällen konnte dabei die Aktivität gegenüber der Leitsubstanz **235** ($IC_{50} = 12 \mu M$, $DC_{50} > 200 \mu M$) um den Faktor 10 (IC_{50}) bzw. um den Faktor 2000 (DC_{50}) gesteigert werden.

Viele der synthetisierten Verbindungen liegen in einem ähnlichen Aktivitätsfenster, wobei auffällt, dass gewisse Substituenten die Aktivität positiv beeinflussen. Unterteilt man das Grundgerüst in eine linke und eine rechte Seite (Abb. 9.12), so kann man feststellen, dass die Verbindungen mit den höchsten Aktivitäten bevorzugt Wasserstoffbrücken-Akzeptoren auf der rechten Seite (Nitro, Pyrrolidin) tragen. Das Substitutionsmuster der linken Seite sieht dagegen etwas uneinheitlicher aus. Verbindungen mit einem Pyridinring (**294-298**), also einer weiteren Interaktionsmöglichkeit über eine Wasserstoffbrückenbindung, zeigen durchweg sehr hohe Aktivitäten und scheinen auf den ersten Blick sinnvolle Substanzen für eine Weiterentwicklung zu sein. Verbindungen mit einer Biphenylgruppe auf der linken Seite besitzen ähnlich gute Aktivitäten, allerdings nur, wenn die rechte Seite das

bevorzugte Substitutionsmuster enthält (**301** und **302**). Wird die Nitrogruppe beispielsweise gegen einen Bromsubstituenten ausgetauscht, erlischt erstaunlicherweise die Aktivität (**300**) vollkommen.

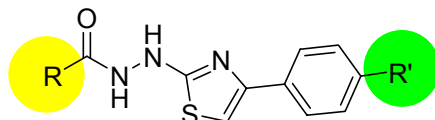


Abbildung 9.12. Grundgerüst der Phenylthiazolbenzhydrazide. gelb: linke Seite, grün: rechte Seite.

Substanz	IC ₅₀ [μM]	DC ₅₀ [μM]	Substanz	IC ₅₀ [μM]	DC ₅₀ [μM]	Substanz	IC ₅₀ [μM]	DC ₅₀ [μM]
294	17.0	1.7	311	3.9	0.7	335	6.9	0.9
295	3.3	0.5	312	n.b.	n.b.	336	4.9	0.7
296	3.1	0.7	313	n.a.	n.a.	337	4.7	1.3
297	2.0	1.4	314	n.a.	n.a.	338	47.2	n.a.
298	23.2	11.1	315	n.b.	n.b.	339	n.a.	127.1
299	n.a.	n.a.	316	n.b.	n.b.	340	60.9	2.0
300	n.a.	n.a.	317	n.b.	n.b.	341	6.3	0.8
301	1.3	1.2	318	n.b.	n.b.	346	5.6	3.2
302	1.9	1.0	319	n.b.	n.b.	347	n.b.	n.b.
303	n.b.	n.b.	320	n.a.	31.7	350	146.5	n.a.
304	n.a.	16.4	321	1.6	0.7	351	10.8	33.5
305	n.a.	168.7	322	n.b.	n.b.	357	n.b.	n.b.
306	13.6	0.4	323	n.b.	n.b.	358	n.b.	n.b.
307	5.8	1.5	324	n.b.	n.b.	364	n.b.	n.b.
308	n.a.	88.0	332	n.a.	n.a.	369	n.b.	n.b.
309	n.a.	n.a.	333	n.a.	n.a.	370	n.b.	n.b.
310	n.a.	n.a.	334	194.5	n.a.	375	n.b.	n.b.

Tabelle 9.1. Biologische Aktivitäten der Phenylthiazolbenzhydrazide. n.a. = nicht aktiv; n.b. = Aktivität nicht bestimmt.

Als besonders potente Verbindung aus der hergestellten Serie konnte Substanz **321** identifiziert werden. Sie besitzt einen Benzimidazolring auf der linken Seite und einen Bromsubstituenten auf der rechten Seite. Besonders gespannt kann man auf die Ergebnisse für die biologische Aktivität der Verbindungen **322** und **323** sein, die beim Erstellen dieser Arbeit noch nicht vorlagen. Diese besitzen auf der rechten Seite die aus den anderen Ergebnissen als "bessere" Substituenten zu bezeichnenden Nitro-

bzw. Pyrrolidengruppen. Sollte die Struktur-Aktivitätsbeziehung schlüssig sein, kann man auf Verbindungen mit zumindest geringfügig gesteigerter Aktivität hoffen.

Neben der guten Aktivität besitzen diese Benzimidazolderivate im Vergleich zu den noch etwas potenteren Biphenyl-Verbindungen einen deutlich niedrigeren cLogP-Wert, was sie als bessere Wirkstoffkandidaten erscheinen lässt. (**300**: cLogP = 6.68, **302**: cLogP = 6.45; **321**: cLogP = 3.78; **323**: cLogP = 3.55).

Substanz	LDH [%]	±	Substanz	LDH [%]	±	Substanz	LDH [%]	±
294	56.8	5.1	311	9.3	4.1	335	46.9	6.7
295	13.6	5.0	312	n.b.	n.b.	336	-1.1	4.9
296	12.9	3.3	313	2.0	1.4	337	42.5	2.9
297	12.5	12.5	314	18.8	7.7	338	8.6	3.9
298	15.4	9.4	315	n.b.	n.b.	339	6.5	4.5
299	3.6	4.5	316	n.b.	n.b.	340	3.8	5.2
300	44.7	9.6	317	n.b.	n.b.	341	4.9	4.9
301	5.0	8.1	318	n.b.	n.b.	346	22.7	9.0
302	6.2	4.6	319	n.b.	n.b.	347	n.b.	n.b.
303	n.b.	n.b.	320	11.5	8.7	350	6.4	3.9
304	8.2	5.1	321	5.2	6.6	351	2.1	3.3
305	4.2	1.8	322	n.b.	n.b.	357	n.b.	n.b.
306	18.7	3.4	323	n.b.	n.b.	358	n.b.	n.b.
307	15.3	12.1	324	n.b.	n.b.	364	n.b.	n.b.
308	15.7	9.7	332	2.6	1.3	369	n.b.	n.b.
309	22.6	8.7	333	4.9	5.2	370	n.b.	n.b.
310	4.6	5.2	334	18.4	10.2	375	n.b.	n.b.

Tabelle 9.2. Ergebnisse des Lactatdehydrogenase-Assays (LDH-Assay), n.b. = Cytotoxizität der Verbindung wurde nicht bestimmt.

Außer der biologischen Aktivität der einzelnen Verbindungen wurden erste Untersuchungen zur Zelltoxizität durchgeführt. In einem Lactatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) wurde die Cytotoxizität von substratbehandelten Zellen photometrisch bei 500 nm durch die Reduzierung von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ und anschließender Konversion eines gelben Tetrazoliumsalzes zu Formazan (rot) bestimmt und relativ zu DMSO quantifiziert (Tab. 9.2). Je kleiner dabei der angegebene prozentuale Wert aus dem LDH-Assay ist, desto geringer kann die Substanz als cytotoxisch angesehen werden. Vergleicht man die Verbindungen mit den höchsten Aktivitäten

miteinander, so erkennt man, dass die Pyridinverbindungen **294-298** alle einen erheblich höheren Wert als die Benzimidazolverbindung **321** aufzeigen.

Unter Berücksichtigung aller erwähnten Faktoren scheinen deshalb die Benzimidazolverbindungen **321-323** die vielversprechendsten Kandidaten dieser Generation zu sein, so dass es nahe liegt dieses Motiv als neue Leitstruktur zur weiteren Verbesserung der Aktivität heranzuziehen.

9.4.2 Aktivitäten der Benzothiazole **387-393**

Die Aktivitäten der Benzothiazole **387-393** können relativ schnell abgehandelt werden. Im Gegensatz zum Benzoxazol **256**, welches als Leitstruktur diente und sowohl als Aggregations- als auch als Depolymerisations-Inhibitor eine relativ hohe Aktivität ($IC_{50} = 2.0 \mu M$, $DC_{50} = 3.0 \mu M$) zeigt, besitzen die Benzothiazol-Derivate **387-393** IC_{50} - und DC_{50} -Werte $>200 \mu M$. Ob der Grund für diese enorme Abnahme der Aktivität an dem veränderten Grundgerüst oder an dem veränderten Substitutionsmuster bedingt durch die unterschiedliche Wahl der zum Aufbau benötigten Aldehyde liegt, kann ohne weitere Untersuchungen nicht gesagt werden.

9.5 Zusammenfassung & Ausblick

Ausgehend von einer Substanzbibliothek von 200.000 Substanzen konnte durch Anwendung des ThS-Assays bei 1266 Verbindungen eine Hemmung der Tau-Aggregation nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung dieser 1266 Strukturen stellte sich heraus, dass 77 Substanzen außerdem bestehende Tau-Aggregate wieder auflösen. Unter Verwendung des Programms CATALYST[®] wurde daraufhin ein pharmakophores Modell erstellt, mit dessen Hilfe ein virtuelles Screening einer Bibliothek von 59676 kommerziell erhältlichen Verbindungen durchgeführt werden konnte. Ergebnis war eine Liste von 136 potentiellen neuen Wirkstoffkandidaten, von denen willkürlich 19 Verbindungen ausgesucht und biologisch getestet wurden. Bei zwei Substanzen konnten vielversprechende Aktivitäten festgestellt werden, wobei allerdings eine Leitstruktur (**241**) mit einem Michael-Akzeptor-Strukturfragment für eine Wirkstoffentwicklung ausschied (Abb. 9.13).

Bibliothek von 200.000 Verbindungen

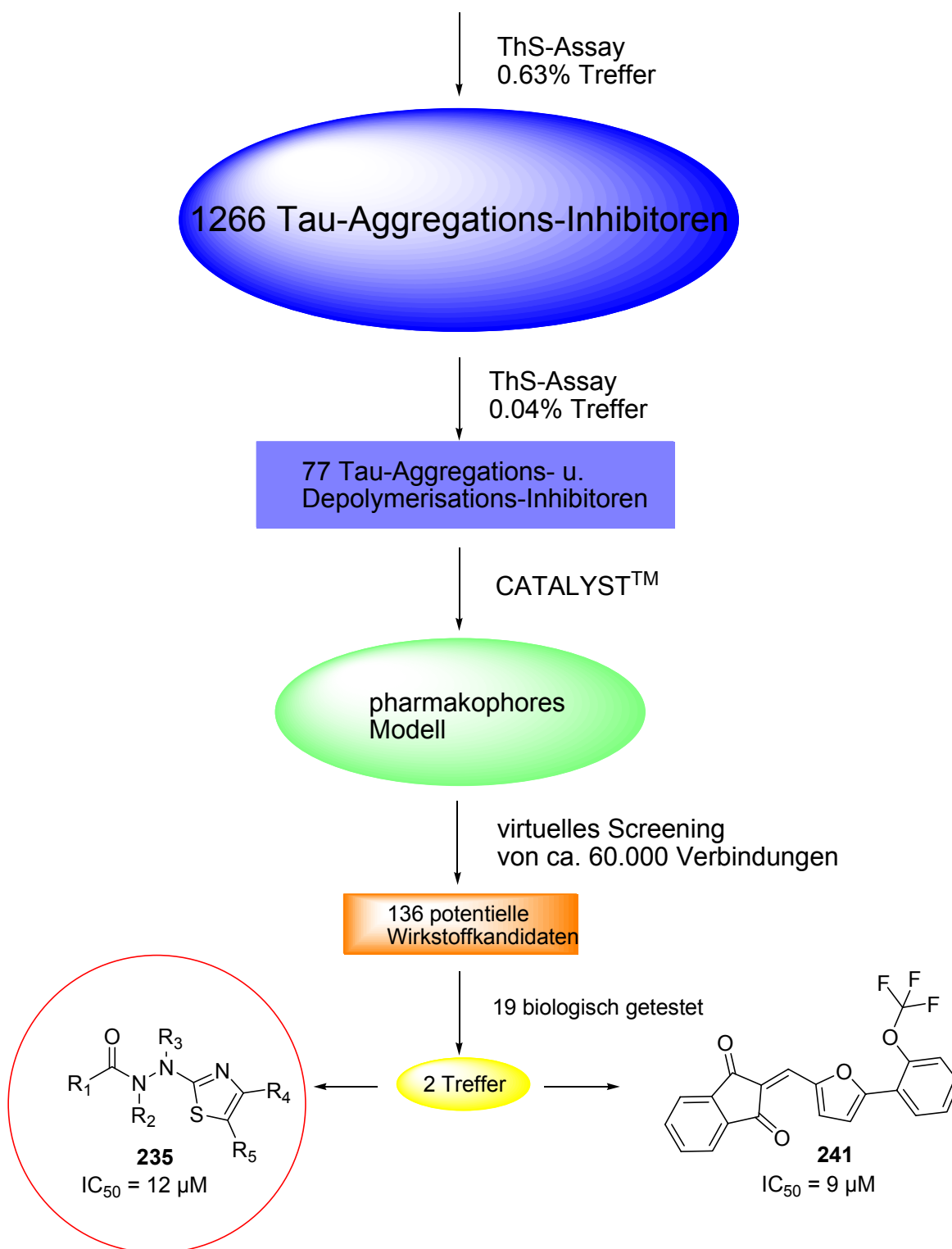


Abbildung 9.13. Schema zur Identifizierung der Phenylthiazolbenzhydrazid-Leitstruktur (**235**).

Zahlreiche Phenylthiazolbenzhydrazid-Derivate wurden in Folge synthetisiert und biologisch getestet. Bei vielen dieser Abkömmlinge konnte eine gesteigerte Aktivität festgestellt werden, ohne dass sie eine Cytotoxizität aufwiesen.

Wie in Kapitel 9.1 bereits beschrieben wurde, besteht in der Alzheimerforschung noch keine einheitliche Auffassung darüber, wie die Krankheit am besten zu bekämpfen ist. Für einige Wissenschaftler, den Tauisten, liegt ein vielversprechender Ansatz darin, die in den Alzheimerprozess involvierte Aggregation von Tau zu unterbinden bzw. zusammengelagertes Tau wieder aufzulösen. Neben Morbus Alzheimer kommen für eine derartige Bekämpfung auch alle anderen Tauopathien (z.B. Kortikosobasale Degeneration, Morbus Pick) in Frage. Mit der Identifizierung der in dieser Arbeit aufgezeigten Phenylthiazolbenzhydrazide, könnte diese Unklarheit unter Umständen beseitigt werden. Durch Verwendung dieser Inhibitor-Klasse bei *in vivo*-Experimenten könnte gezeigt werden, ob sich die Krankheitssymptome verbessern, falls es zu keiner Tau-Aggregation kommt bzw. Aggregate wieder verschwinden. Das Phenylthiazolbenzhydrazid-Leitmotiv bietet außerdem genügend Spielraum, um die biologischen Aktivitäten bzw. das pharmakologische Profil weiter zu verbessern.

Betrachtet man die Leitstruktur (Abb. 9.14) so erkennt man, dass prinzipiell fünf verschiedene Substituenten eingebaut werden können, so dass eine breite Auswahl an Derivaten denkbar ist, je nachdem welche Ausgangsverbindungen gewählt werden.

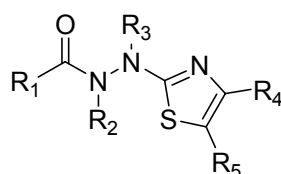


Abbildung 9.14. Struktur des Thiazolhydrazidgrundgerüsts.

Austausch des Thiazol-Heteroaromaten durch eine große Bandbreite anderer Fünfringheteroatomcyclen stellt eine weitere vielversprechende Variationsmöglichkeit dar. Neben den bereits in Kapitel 9.3 beschriebenen Möglichkeiten zur Aktivitätssteigerung ist die direkte Verknüpfung eine interessante Strategie zur Verbesserung der biologischen Aktivität. Abbildung 9.15 sind einige interessante Strukturen zu entnehmen, die in nachfolgenden Projekten hergestellt werden sollten.

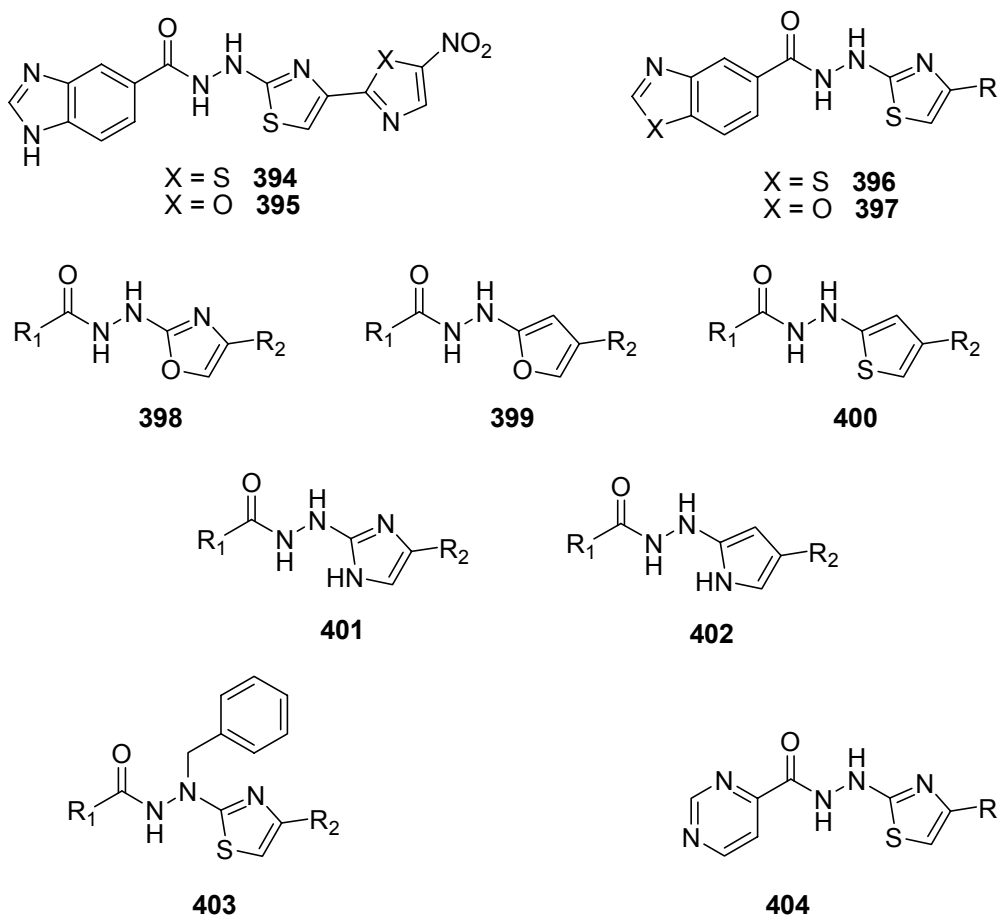


Abbildung 9.15. Strukturvorschläge von Substanzen, die z. T. eine Steigerung der Aktivität erwarten lassen bzw. die Erkenntnisse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen erweitern.

10 Zusammenfassung

Die meisten heute verfügbaren Alzheimer-Medikamente nutzen, dass bei der Erkrankung ein Großteil der Neuronen abstirbt, die den Neurotransmitter Acetylcholin freisetzen. Indem diese Wirkstoffe dafür sorgen, dass der normale Abbau von Acetylcholin gebremst wird, wird der effektive Wert des Botenstoffs kaum verringert, so dass der geistige Verfall verlangsamt wird. Allerdings helfen solche Präparate meist nur sechs bis zwölf Monate, da der fortsetzende Neuronenverlust nicht aufgehalten wird.

Die Entwicklung von Medikamenten, die der Alzheimer-Demenz entgegensteuern, bleibt das große Ziel der Alzheimerforschung.

Noch vor Jahren wäre die Aussicht auf eine baldige Entwicklung einer solchen Therapie schwer vorstellbar gewesen. Doch die Forschungsergebnisse der letzten Zeit lassen die molekularen Ursachen der Erkrankung immer besser verstehen und nähren die Hoffnung, die Krankheit bald im Frühstadium therapieren zu können.

Momentan existieren etliche Strategien, die darauf abzielen, den Hirnverfall zu stoppen. Die einzelnen Projekte dieser Arbeit greifen dabei verschiedene Ansätze auf und versuchen Beiträge zu liefern, um die Entwicklung potentieller Konzepte voranzubringen.

10.1 Die molekularen Zusammenhänge von Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer geht mit zwei auffallenden molekularen Veränderungen im Hirngewebe einher. Zum einen handelt es sich um proteinhaltige Ablagerungen außerhalb der Nervenzellen, Plaques genannt, zum anderen um filamentöse Zusammenlagerungen des Proteins Tau in den Nervenzellen und deren signalleitenden Fortsätzen, den Neurofibrillären Bündeln (*tangles*). Es wird davon ausgegangen, dass beide molekularen Gebilde einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsentstehung nehmen. Über die Art und Weise dieses Einflusses herrscht allerdings noch Uneinigkeit. Die Mehrzahl der Alzheimerforscher verfolgt dabei eine Vorstellung, die als Amyloid-Kaskaden-Hypothese bezeichnet wird.

Ein in der Zellmembran verankertes Protein, das Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) wird durch Einwirkung dreier Proteasen, der α -, β - und γ -

Sekretase in verschiedene Abschnitte zerlegt. Das Zusammenspiel von β - und γ -Sekretase liefert dabei ein Fragment, das A β genannt wird. Die abgetrennten Beta-Amyloide lagern sich zu kleinen Gebilden zusammen, die, wenn sie in ausreichender Menge vorhanden sind, die Plaques bilden. Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese geht davon aus, dass die Bildung dieser A β -Fragmente eine verheerende Reaktionskaskade auslöst, in deren Folge sich auch die Eigenschaften der Tau-Proteine innerhalb der Nervenzellen verändern. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Es hilft diese zu stabilisieren und übernimmt wichtige Funktionen im Stofftransport. Im Krankheitsverlauf scheint die Aufgabe verschiedener Kinasen, darunter die Glykogen Synthase Kinase 3, gestört zu sein. Sie sorgen dafür, dass Tau mit Phosphatgruppen bestückt wird. Während einer Alzheimererkrankung überladen sie Tau allerdings förmlich mit Phosphat, so dass es die Interaktion mit den Mikrotubuli verliert, verfilzt und die charakteristischen Neurofibrillären Bündel ausbildet. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen, den so genannten Tauopathien, scheinen Tau-Filamente alleine ein Absterben von Nervenzellen zu bewirken.

Bei der Betrachtung dieser molekularen Ursachen der Alzheimererkrankung ergeben sich viele Ansatzpunkte, um das Fortschreiten aufzuhalten. Verfolgt man die Amyloid-Kaskaden-Theorie, wäre es natürlich günstig, die Prozesskaskade gleich am Anfang zu unterbrechen. Durch Blockieren der beteiligten β - und γ -Sekretase, könnte z.B. die Bildung von A β verhindert werden.

10.2 Tetron- und Tetramsäuren als BACE-Inhibitoren

Sowohl die β - als auch die γ -Sekretase werden zur Familie der Aspartylproteasen gezählt. Es handelt sich dabei um eine sehr gut erforschte Enzymklasse, nicht zuletzt auch dadurch, dass zur Behandlung von Aids bzw. bei Bluthochdruck Aspartylproteasehemmer erfolgreich eingesetzt werden. Kapitel 4 dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung einer Methode zur festphasenunterstützten Synthese einer Reihe von Tetron- bzw. Tetramsäuren, die als potentielle Kandidaten zur Inhibition der β -Sekretase angesehen werden können. Die Auswertung der biologischen Ergebnisse bestätigt, dass zahlreiche der hergestellten Verbindungen die β -Sekretase im mikromolaren Bereich hemmen. Das Grundgerüst der Tetron- bzw. der Tetramsäuren besitzt den Vorteil gegenüber den meisten bisher

entwickelten potentiellen Wirkstoffen, dass es sich um eine nicht-peptidische Leitstruktur handelt. Diese haben prinzipiell ein besseres pharmakologisches Profil als peptidische Inhibitoren, gerade dann, wenn es darum geht die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die ermittelten Aktivitäten der hergestellten Substanzen sind allerdings noch nicht gut genug, um die entsprechenden Verbindungen als potentielle Wirkstoffkandidaten anzusehen. Als Ausgangspunkt für eine weitere Verbesserung können sie allerdings hilfreiche Informationen liefern.

10.3 γ -Sekretase-Inhibitoren

Ein weiterer Ansatzpunkt, um den Verlauf der Alzheimerkrankheit zu stoppen, wird mit dem Blockieren der sehr komplexen γ -Sekretase verfolgt. Die γ -Sekretase schneidet das APP bemerkenswerterweise mitten in der Zellmembran. Sie zählt deshalb zu einer neuen Proteaseklasse, welche offenbar mittels eines besonderen chemischen Mechanismus innerhalb von Zellmembranen tätig ist. Verschiedene Experimente deuten darauf hin, dass die γ -Sekretase, genau wie die β -Sekretase, zur Familie der Aspartylproteasen zählt. Eine Röntgenstrukturanalyse blieb allerdings bislang versagt, weshalb die genaue Struktur des Enzyms, speziell der aktiven „Tasche“, fehlt. Es scheint heute als erwiesen, dass dieser aus den Proteinen Presenilin1 oder 2, Nicastrin, Aph-2 und PEN-2 besteht. Auf den Presenilinen wird das aktive Zentrum vermutet, diese allein sind allerdings nicht ausreichend für eine enzymatische Aktivität. Die Einführung säurelabiler Gruppen an verschiedenen Positionen eines bekannten γ -Sekretase-Inhibitor-Rückgrates, sollte neue Erkenntnisse über die Bindungsverhältnisse zwischen Enzym und Hemmstoff liefern. Die angestrebten Ergebnisse blieben allerdings ohne Erfolg. Die Identifizierung neuer γ -Sekretase-Antagonisten kann aber für weitere Ansätze sinnvoll verwendet werden.

Unklar bleibt bis heute die Frage, wo im sekretorischen Transportweg die vollständige Reifung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes stattfindet. Vieles deutet darauf hin, dass die einzelnen Bestandteile solange im ER verweilen, wie der Komplex noch nicht komplett entwickelt ist. Erst nach einer vollständigen Zusammenlagerung der Komponenten, der Endoproteolyse des PS und der Konformationsänderung des Nicastrins scheint das Protein-Quartett das ER zu verlassen und zu seinem Wirkungsort transportiert zu werden. Weitere Unklarheiten

bestehen vor allem über die Funktionsweise der intramolekularen Substraterkennung und –spaltung der γ -Sekretase. Schwierig ist in diesem Zusammenhang vor allem die Erklärung, wie das für die Proteolyse benötigte Wasser in der hydrophoben Umgebung der Zellmembran zur Verfügung gestellt wird. Verschiedene Theorien wurden vorgeschlagen, so dass über die Lokalisierung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes Uneinigkeit besteht.

In Kapitel 6 dieser Arbeit wird die Synthese eines potentiell membran-undurchlässigen γ -Sekretase-Inhibitors beschrieben. Eine Lokalisierung des aktiven Komplexes innerhalb der Zelle erscheint vor diesem Hintergrund eher unwahrscheinlich.

10.4 Inhibition von GSK3 β

Neben der vielversprechenden Möglichkeit zur Ausschaltung der A β -Bildung über die Blockierung der β - und γ -Sekretase, gehen Versuche dahin, das Auftreten der Neurofibrillenbündel zu verhindern. Ein Ziel ist dabei die Blockade jener Kinasen, welche das Tau-Protein mit Phosphatgruppen überfrachten. Durch die Verknüpfung von Tau mit APP bzw. der γ -Sekretase über die Glykogen Synthase Kinase 3 ergibt sich die Hoffnung, dass vielleicht eine Substanz in der Lage sein könnte, beide pathogenen Merkmale der Alzheimer-Demenz zu unterbinden. Ein von AstraZeneca bekanntes selektives GSK3 β -Grundgerüst wurde deshalb, wie in Kapitel 7 beschrieben, chemisch verändert und auf die Möglichkeit zur Hemmung von A β und der Tau-Phosphorylierung getestet. Es konnte gezeigt werden, dass diejenigen Verbindungen, welche in naher chemischer Verwandtschaft zum gewählten AstraZeneca-Leitmotiv stehen, lediglich die Tau-Phosphorylierung verhindern. Die A β -Bildung blieb von diesen Substanzen nahezu unberührt. Bei einem der Derivate konnte eine erhebliche A β -Reduzierung festgestellt werden, die allerdings ohne Hemmung der Tau-Phosphorylierung einherging. Es kann der Verdacht geäußert werden, dass es sich dabei um einen γ -Sekretase-Modulator handelt. Diese Vermutung muss allerdings durch weitere Experimente bestätigt werden.

10.5 Tau-Inhibitoren

Die Aggregation des Tau-Proteins in *paired helical filaments* (PHFs) ist, wie bereits erwähnt, eines der Hauptkennzeichen einer Alzheimererkrankung. Verbindungen, welche diese Zusammenlagerung verhindern bzw. bereits vorhandene Filamente auflösen, sind deshalb von großem Interesse in der Alzheimer-Wirkstoffentwicklung. Unter Verwendung der Software CATALYST[®] gelang es, ein pharmakophores Modell für Tau-Aggregations- bzw. Tau-Depolymerisations-Inhibitoren zu erstellen. Durch virtuelles Screening konnte eine Substanzklasse identifiziert werden, die sowohl die Bildung der Neurofibrillären Bündel verhindert als auch bereits bestehende Tau-Aggregate wieder auflöst. Die aufgezeigten Ergebnisse verdeutlichen außerdem den großen Wert eines ligandenbasierten virtuellen Screenings zum Auffinden neuer Leitstrukturen, besonders dann, wenn keine dreidimensionalen Informationen eines *targets* vorhanden sind.

Durch die gezielte Synthese weiterer Verbindungen mit verschiedenen Strukturvariationen konnten die ersten Aktivitäten weiter gesteigert werden. Zudem wurde bei ersten Cytotoxizitätsexperimenten verdeutlicht, dass es sich um eine für die Wirkstoffentwicklung vielversprechende Verbindungsklasse mit gutem pharmakologischem Profil handelt.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen und Analysegeräte

Lösungsmittel

Die für den Einsatz in wasserempfindlichen Reaktionen verwendeten Lösungsmittel THF und DMF wurden bei der Firma Fluka gekauft, entsprechendes Diethylether und Toluol stammen von der Firma Riedel-de Haën. Piperidin, Pyridin und DCM wurden nach Standardverfahren gereinigt und getrocknet.^[299] Alle übrigen Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert.

Edukte und **Reagenzien** wurden bei verschiedenen Anbietern (Acros-Organics, Alfa Aesar, Fluka, Lancaster, Maybridge, Merck, Novabiochem, Sigma-Aldrich) gekauft und direkt eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie:

Die qualitative Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck. Die Entwicklung der DC-Platten wurde neben der Detektion der Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm [UV] durch Eintauchen in eine der folgenden Lösungen durchgeführt:

Ninhydrin-Lösung: 0.5 g Ninhydrin, 100 mL Isopropanol, 5 mL Eisessig (Eintauchen und anschließende Wärmebehandlung).

Cersulfat-/Phosphormolybdänsäure-Lösung: 25 g Phosphormolybdänsäure, 10 g Ce(SO₄)₂·H₂O, 60 mL konz. H₂SO₄, 940 mL H₂O (Eintauchen und anschließende Wärmebehandlung)

Jod-Bad: 30 g Jod, 20 g KI, 200 mL EtOH, 200 mL H₂O (Eintauchen und trocknen lassen).

Flash-Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase für die Flash-Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 15-40 μ m) der Firma Merck verwendet. Die Trennungen wurden bei RT durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor destilliert.

Kernresonanz-Spektroskopie:

NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern ARX 300 und DRX 500 der Firma Bruker Biospin GmbH aufgenommen.

Die jeweilige Messfrequenz und das verwendete Lösungsmittel sind den spektroskopischen Daten in Klammern vorangestellt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zu Tetrametylsilan als internen Standard ($\delta = 0$ ppm) angegeben. Zur Bezeichnung der Feinstrukturen der Protonen-Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplett), *q* (Quartett), *m* (Multiplett). Die Kopplungskonstanten *J* werden in Hertz angegeben.

Massenspektrometrie:

ESI-MS-Spektren wurden mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer und EI-MS-Spektren mit einem doppelt fokussierenden Massenspektrometer MAT 95 aufgenommen. Die detektierten Ionenmassen *m/z* werden in u, die relativen Intensitäten in % bezüglich des intensiven Signals angegeben.

Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktbestimmungs-Apparatur FP5 der Firma Mettler bestimmt und sind unkorrigiert.

Drehwerte:

Die Drehwerte wurden mit einem Perkin Elmer Polarimeter 241 mit Haake D8 Thermostat aufgenommen. Die Messungen erfolgten in 1 dm Küvetten.

Elementaranalysen:

Elementaranalysen wurden mit Hilfe eines C,H,N-Analyseapparates Vario EL III Firma *Elementar* durchgeführt. Die berechneten und gefundenen Werte sind Angaben in Gewichtsprozent.

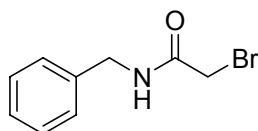
Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie:

HPLC-Messungen erfolgten an einem Agilent 1100 (Säule: reversed-phase, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm; Wellenlängendetektion bei 254 nm). Als Laufmittel wurden Acetonitril und Wasser in verschiedenen Gradientenmischungen verwendet.

11.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Bromacetamide 86-89

Entsprechendes Amin (30 mmol) und NaHCO_3 (2.52 g, 30 mmol) werden bei 0°C in 30 mL DCM gelöst/suspendiert und tropfenweise mit Bromacetyl bromid (36 mmol, 3.13 mL) versetzt. Der Ansatz wird zunächst 1 h bei 0°C und danach 2 h bei RT gerührt. Anschließend werden unter Eiskühlung ca. 30 mL Wasser zugegeben. Die organische Phase wird 3 x mit 2N HCl-Lsg. und 1 x mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

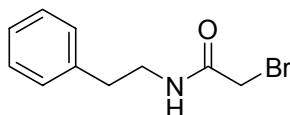
11.2.1 Herstellung von *N*-Benzyl-2-bromacetamid 86



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 4.79 g (70%) Bromacetamid **86** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 110°C (MeOH)

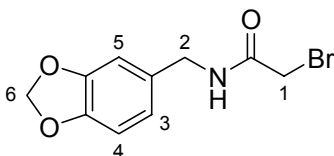
11.2.2 Herstellung von *N*-Benzyl-2-bromacetamid 87



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 5.23 g (72%) Bromacetamid **87** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 62°C (MeOH)

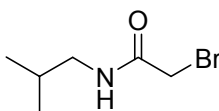
11.2.3 Herstellung von *N*-((Benz[*d*][1,3]dioxol-6-yl)methyl)-2-bromacetamid (**88**)



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 4.90 g (60%) Bromacetamid **88** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.32 (*t*, 1H, NH, *J* = 5.9 Hz), 6.76–6.62 (*m*, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 5.92 (*s*, 2H, 6-H), 4.41 (*d*, 2H, 2-H, *J* = 5.7 Hz), 4.08 (*s*, 2H, 1-H) ppm.

11.2.4 Herstellung von 2-Brom-*N*-isobutylacetamid (**89**)



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 2.74 g (47%) Bromacetamid **89** als farbloser Feststoff erhalten.

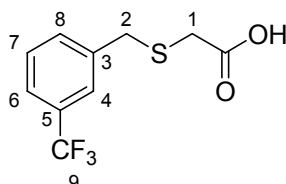
Schmp.: 40°C (MeOH)

11.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thioessigsäure-Derivate **30/31, 33-41**

Thioglykolsäure (2.30 g, 25 mmol) und TEA (5.57 g, 55 mmol) werden bei 0°C in Acetonitril (30 mL) gelöst und für ca. 30 min gerührt (0°C). Der Ansatz wird mit der Halogenverbindung (25 mmol) versetzt und unter Argonatmosphäre am Rückfluss erhitzt (ca. 4 h). Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL H₂O versetzt, mit 2N HCl-Lsg. auf pH 1-3 gebracht und im Vakuum vom Acetonitril befreit. Die wässrige Phase wird

3 x mit EE (30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

11.3.1 Herstellung von 2-(3-(Trifluormethyl)benzyl)thioessigsäure (30)

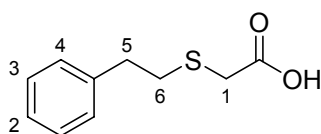


Ausbeute: 4.19 g (67%) von Thioessigsäure **30** als gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.55 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.67–7.58 (m, 4H, 4-H, 6-H, 7-H, 8-H), 3.91 (s, 2H, 2-H), 2.13 (s, 2H, 1-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.1 (COOH), 139.5 (3-C), 133.0 (8-C), 129.4 (7-C), 125.3 (4-C), 123.6 (6-C), 34.7 (2-C), 32.6 (1-C) ppm.

11.3.2 Herstellung von 2-(Phenethyl)thioessigsäure (31)

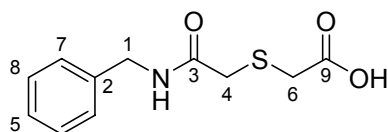


Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 3.04 g (62%) Thioessigsäure **31** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 60°C (*n*-Hexan)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.60 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.29–7.20 (m, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 3.26 (s, 2H, 1-H), 2.83 (s, 4H, 2-H, 3-H) ppm.

11.3.3 Herstellung von 2-((Benzylcarbamoyl)methyl)thioessigsäure (33)



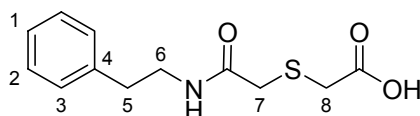
Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan/EE werden 3.17 g (53%) Thioessigsäure **33** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 91–93°C (*n*-Hexan/EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.66 (breites s, 1H, Carbonsäure), 8.54 (s, 1H, NH); 7.35–7.25 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 4-H), 4.28 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.8 Hz), 3.39 (s, 2H, 8-H), 3.28 (s, 2H, 7-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.7 (COOH), 168.2 (CONR), 138.9 (3-C), 128.0 (1-C), 126.9 (4-C), 126.5 (2-C), 42.0 (8-C), 34.3 (7-C), 33.4 (5-C) ppm.

11.3.4 Herstellung von 2-((Phenylethylcarbamoyl)methyl)-thioessigsäure (34)



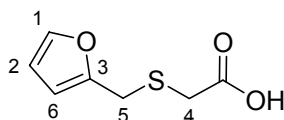
Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan/EE werden 5.19 g (82%) Thioessigsäure **34** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 108–109°C (*n*-Hexan/EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.63 (breites s, 1H, Carbonsäure), 8.10 (s, 1H, NH), 7.31–7.17 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 3.33 (s, 2H, 8-H), 3.30–3.25 (*m*, 2H, 6-H), 3.19 (s, 2H, 7-H), 2.71 (*t*, 2H, 5-H, *J* = 7.3 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.0 (COOH), 168.3 (CONR), 138.9 (4-C), 128.6 (2-C), 128.2 (3-C), 126.0 (1-C), 40.4 (8-C), 34.9 (7-C), 34.6 (6-C), 33.7 (5-C) ppm.

11.3.5 Herstellung von 2-((Furan-2-yl)methyl)thioessigsäure (35)

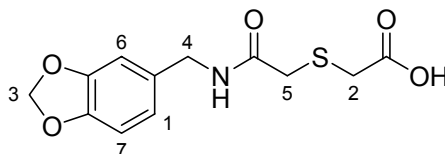


Ausbeute: 3.19 g (74%) von Thioessigsäure **35** als farbloses Öl

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.64 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.58 (s, 1H, 1-H), 6.40–6.37 (m, 1H, 2-CH), 6.27 (d, 1H, 3-H, J = 3.1 Hz), 3.85 (s, 2H, 5-H), 3.20 (s, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 182.6 (COOH), 162.2 (3-C), 154.1 (6-CH), 122.0 (5-CH), 119.4 (4-CH), 126.0 (8-C), 44.2 (1-CH₂), 39.1 (2-CH₂) ppm.

11.3.6 Herstellung von 2-((Benz[d][1,3]dioxol-6-yl)methyl)thioessigsäure (36)

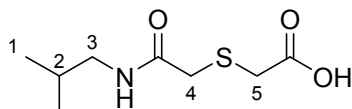


Nach Umkristallisation aus Diethylether werden 5.67 g (80%) Thioessigsäure **36** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 122°C (Diethylether)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.68 (breites s, 1H, Carbonsäure), 8.47 (t, 1H, NH, *J* = 5.8 Hz), 6.86–6.72 (*m*, 3H, 1-H, 2-H, 3-H), 5.98 (s, 2H, 4-H), 4.18 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.9 Hz), 3.38 (s, 2H, 7-H), 3.26 (s, 2H, 6-H) ppm.

11.3.7 Herstellung von 2-((Isobutylcarbamoyl)methyl)thioessigsäure (37)

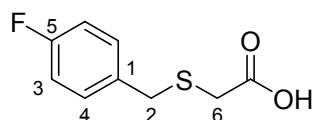


Ausbeute: 3.80 g (74%) von Thioessigsäure **37** als gelbliches Öl

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.46 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.99 (s, 1H, NH), 3.36 (s, 2H, 5-H), 3.21 (s, 2H, 4-H), 2.88 (t, 2H, 3-H, *J* = 6.3 Hz), 1.68 (*td*, 1H, 2-H, *J* = 6.7, 13.4 Hz), 0.84 (*d*, 6H, 1-H, *J* = 6.7 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.3 (COOH), 168.7 (CONR), 46.4 (3-C), 34.9 (5-C), 34.0 (4-C), 28.2 (2-C), 20.3 (1-C) ppm.

11.3.8 Herstellung von 2-(4-Fluorbenzyl)thioessigsäure (38)



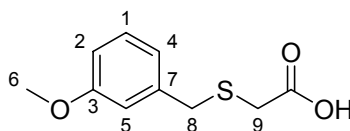
Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 4.56 g (91%) Thioessigsäure **38** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 67°C (*n*-Hexan)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.60 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.33 (*dd*, 2H, 1-H, *J* = 5.7, 8.4 Hz), 7.12 (t, 2H, 3-H, *J* = 8.8 Hz), 3.79 (s, 2H, 5-H), 3.10 (s, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.2 (COOH), 162.8 (2-C), 159.6 (4-C), 134.0, 130.9, 115.3 (arom. C), 34.5 (1-C), 32.5 (2-C) ppm.

11.3.9 Herstellung von 2-(3-Methoxybenzyl)thioessigsäure (39)

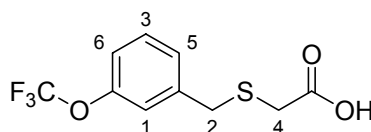


Ausbeute: 5.20 g (98%) von Thioessigsäure **38** als farbloses Öl

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.62 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.03 (*m*, 1H, 6-H), 6.62–6.57 (*m*, 3H, 1-H, 3-H, 5-H), 3.73 (s, 3H, 7-H), 3.62 (s, 2H, 8-H), 3.38 (s, 2H, 9-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 172.2 (COOH), 160.8 (2-C), 138.6 (4-C), 129.4 (6-C), 121.2 (5-C), 112.8 (1-C, 3-C), 56.0 (7-C), 44.0 (9-C), 39.0 (8-C) ppm.

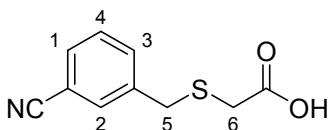
11.3.10 Herstellung von 2-(3-Trifluormethoxybenzyl)thioessigsäure (40)



Ausbeute: 5.46 g (82%) von Thioessigsäure **40** als farbloses Öl

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.43 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.01 (*m*, 1H, 4-H), 6.73–6.61 (*m*, 3H, 3-H, 5-H, 6-H), 3.68 (s, 2H, 1-H), 3.30 (s, 2H, 2-H) ppm.

11.3.11 Herstellung von 2-(3-Cyanbenzyl)thioessigsäure (**41**)



Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 4.66 g (90%) Thioessigsäure **41** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 66-68°C (*n*-Hexan)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.62 (breites s, 1H, Carbonsäure), 7.60 (*d*, 1H, 3-H, *J* = 7.4 Hz), 7.50–7.48 (*m*, 2H, 2-H, 4-H), 7.46 (*d*, 1H, 1-H, *J* = 7.4 Hz), 3.70 (*s*, 2H, 6-H), 3.38 (*s*, 2H, 5-H) ppm.

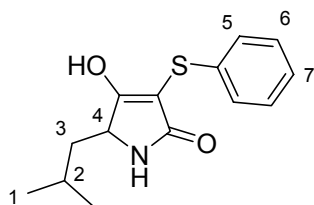
11.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Tetramsäuren **43-85**

Wang-PS-Harz (**22**, Beladung: 1.1 mmol/g, 300 mg, 0.33 mmol) wird in 3 mL DMF bei RT für ca. 15 min suspendiert, mit einer Lösung von Fmoc-geschützter Aminosäure (**23-26**, 0.66 mmol) und Pyridin (86 mg, 1.08 mmol) in ca. 1.5 mL DMF versetzt und 20 min bei RT geschüttelt. Anschließend wird Dichlorbenzoylchlorid (138 mg, 0.66 mmol) zugegeben und erneut bei RT geschüttelt. Nach 20 min wird das Harz (**27**) intensiv gewaschen (DMF, DCM, DMF, je 5 x 5 mL) und zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in DMF suspendiert (5 mL, 5 min). Es wird eine Lösung von 20% Piperidin in DMF hinzugefügt und geschüttelt (1 x 5 min, 1 x 25 min, je 5 mL).

Anschließend wird das entschützte Harz (**28**) in ca. 3 mL DMF bei RT für 5 min suspendiert und mit einer Lösung von Thioessigsäure-Derivat (**29-41**, 1 mmol), PyBOP (520 mg, 1 mmol), HOBt (153 mg, 1 mmol) und DIEA (259 mg, 2 mmol) in 2 mL DMF versetzt. Die Reaktionsmischung wird für ca. 20 h bei RT geschüttelt, filtriert und gewaschen (DMF, DCM, THF, je 5 x 5 mL).

Danach wird das Harz **42** in THF (4 mL) suspendiert, mit KO^tBu (45 mg, 0.4 mmol) versetzt und unter Rückfluss gerührt. Nach 1 h wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Harz mit EE (3 x 10 mL) gewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und mit 1N NaOH-Lsg. (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten alkalischen Extrakte werden mit *n*-Hexan (2 x 10 mL) gewaschen, mit 2N HCl-Lsg. angesäuert und mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

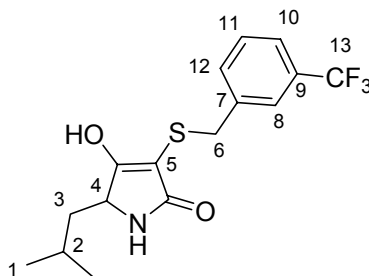
11.4.1 Herstellung von 4-Hydroxy-5-isobutyl-3-(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**43**)



Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan/EE werden 23 mg (26%) Tetramsäure **43** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.30 (breites s, 1H, Enol), 7.71 (s, 1H, NH), 7.24–7.08 (*m*, 5H, 5-H, 6-H, 7-H), 3.74 (*dd*, 1H, 4-H, J = 3.0, 9.7 Hz), 1.71–1.59 (*m*, 1H, 2-H), 1.40 (*ddd*, 1H, 3-H, J = 3.0, 8.4, 9.7 Hz), 0.97–0.84 (*m*, 1H, 3-H), 0.82 (*d*, 3H, 1-H, J = 6.0 Hz), 0.78 (*d*, 3H, 1-H, J = 6.1 Hz) ppm.

11.4.2 Herstellung von 3-(Trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-3-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (44)



Nach Umkristallisation aus EE werden 55 mg (48%) Tetramsäure **44** als farbloser Feststoff erhalten.

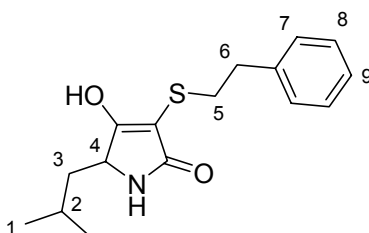
Schmp.: 172°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.31 (breites s, 1H, Enol), 7.73 (s, 1H, NH), 7.54–7.46 (*m*, 4H, 8-H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.05–3.87 (*m*, 2H, 6-H), 3.78 (*dd*, 1H, 4-H, *J* = 3.0, 9.8 Hz), 1.70–1.59 (*m*, 1H, 2-H), 1.39 (*ddd*, 1H, 3-H, *J* = 3.1, 8.4, 9.7 Hz), 0.98–0.86 (*m*, 1H, 3-H), 0.80 (*d*, 3H, 1-H, *J* = 6.0 Hz), 0.78 (*d*, 3H, 1-H, *J* = 6.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 177.8 (C-OH), 172.0 (CONR), 140.4 (7-C), 133.2 (12-C), 129.3 (9-C), 128.7 (11-C), 125.4 (8-C), 123.6 (10-C), 94.3 (5-C), 54.7 (4-C), 41.8 (6-C), 35.4 (3-C), 24.4, 23.7 (2 CH₃) ppm.

MS (EI): 345 (16, *M*⁺), 289 (16), 186 (24), 159 (100), 99 (56), 86 (20).

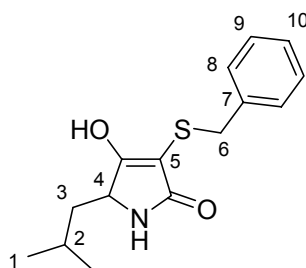
11.4.3 Herstellung von 4-Hydroxy-5-isobutyl-3-(phenethylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (45)



Ausbeute: 54 mg (56%) von Tetramsäure **45** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.35 (breites s, 1H, Enol), 7.76 (s, 1H, NH), 7.21–7.08 (m, 5H, 7-H, 8-H, 9-H), 3.76 (dd, 1H, 4-H, J = 2.9, 9.6 Hz), 3.22–3.20 (m, 2H, 6-H), 3.14–3.06 (m, 2H, 5-H), 1.70–1.54 (m, 1H, 2-H), 1.38 (ddd, 1H, 3-H, J = 3.0, 8.4, 9.7 Hz), 0.93–0.84 (m, 1H, 3-H), 0.80 (d, 3H, 1-H, J = 6.0 Hz), 0.77 (d, 3H, 1-H, J = 6.1 Hz) ppm.

11.4.4 Herstellung von 3-(Benzylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (**46**)

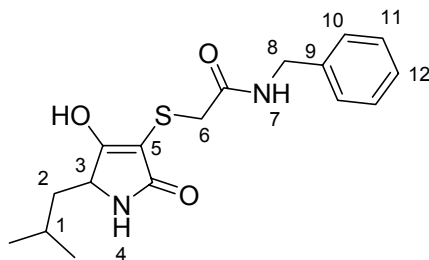


Nach Umkristallisation aus EE werden 55 mg (48%) Tetramsäure **46** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.30 (breites s, 1H, Enol), 7.73 (s, 1H, NH), 7.25–7.23 (m, 5H, 8-H, 9-H, 10-H), 3.88 (d, 1H, 4-H, J = 3.9 Hz), 3.83 (dd, 2H, 6-H, J = 2.5, 9.4 Hz), 1.74–1.65 (m, 1H, 2-H), 1.45 (ddd, 1H, 3-H, J = 3.3, 9.7, 13.1 Hz), 1.40 (ddd, 1H, 3-H, J = 4.3, 9.8, 13.7 Hz), 0.85 (d, 3H, CH_3 , J = 3.8 Hz), 0.83 (d, 3H, CH_3 , J = 3.8 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 176.1 (C-OH), 171.1 (CONR), 137.6 (7-C), 128.0 (9-C), 127.3 (8-C), 125.8 (10-C), 94.3 (5-C), 53.6 (4-C), 40.8 (6-C), 35.2 (3-C), 23.5, 22.9 (2 CH_3), 20.7 (2-C) ppm.

11.4.5 Herstellung von 2-(2,5-Dihydro-4-hydroxy-5-isobutyl-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-benzylacetamid (**47**)

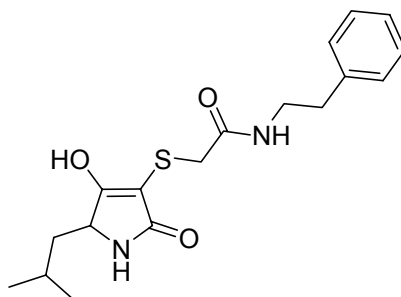


Ausbeute: 45 mg (45%) von Tetramsäure **47** als gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.48 (breites s, 1H, Enol), 8.92 (t, 0.5H, 7-H, J = 5.2 Hz), 8.52 (t, 0.5H, 7-H, J = 5.2 Hz), 7.80 (s, 1H, 4-H), 7.35–7.25 (m, 5H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.31–4.27 (m, 2H, 8-H), 3.92 (dd, 1H, 3-H, J = 2.7, 9.3 Hz), 3.38 (s, 2H, 6-H), 1.82–1.73 (m, 1H, 1-H), 1.54 (ddd, 1H, 2-H, J = 3.3, 9.7, 13.0 Hz), 1.19 (ddd, 1H, 2-H, J = 4.3, 9.7, 13.6 Hz), 0.89 (d, 3H, CH_3 , J = 2.5 Hz), 0.87 (d, 3H, CH_3 , J = 2.6 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 170.9 (C-OH), 169.9 (CONR), 168.4 (CONR), 139.1 (9-C), 138.6 (11-C), 128.2 (10-C), 126.8 (12-C), 95.0 (5-C), 54.6 (3-C), 42.2 (8-C), 34.5 (2-C), 33.7 (6-C), 24.2, 23.5 (2 CH_3), 21.5 (1-C) ppm.

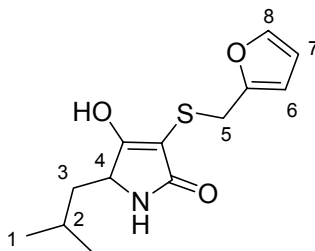
11.4.6 Herstellung von 2-(2,5-Dihydro-4-hydroxy-5-isobutyl-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-phenethylacetamid (**48**)



Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 44 mg (42%) Tetramsäure **48** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

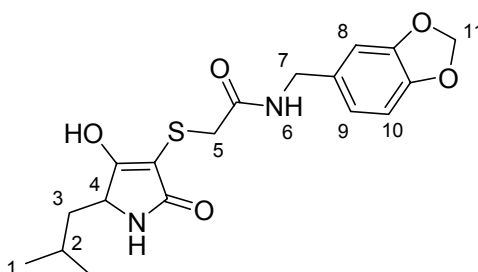
11.4.7 Herstellung von 3-((Furan-2-yl)methylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (49)



Ausbeute: 30 mg (37%) von Tetramsäure **49** als braunes Öl

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.52 (breites s, 1H, Enol), 7.90 (s, 1H, 8-H), 7.32–7.30 (*m*, 2H, 6-H, 7-H), 3.84 (s, 2H, 5-H), 1.74–1.70 (*m*, 1H, 1-H), 1.52 (*ddd*, 1H, 2-H, *J* = 3.3, 9.5, 13.5 Hz), 1.22 (*ddd*, 1H, 2-H, *J* = 3.5, 9.5, 13.5 Hz), 0.87 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 1.9 Hz), 0.85 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 1.9 Hz) ppm.

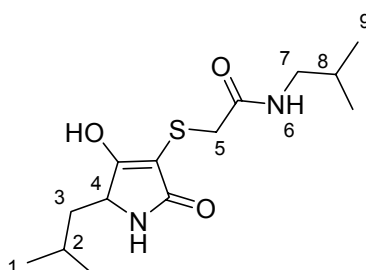
11.4.8 Herstellung von 2-(2,5-Dihydro-4-hydroxy-5-isobutyl-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-*N*-(benz[*d*][1,3]dioxol-5-yl)methyl)acetamid (50)



Ausbeute: 51 mg (45%) von Tetramsäure **50** als gelbes Öl

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.32 (breites s, 1H, Enol), 8.51 (t, 1H, 6-NH, *J* = 5.9 Hz), 7.74 (s, 1H, NH), 6.88-6.74 (*m*, 3H, 8-H, 9-H, 10-H), 5.96 (s, 2H, 11-H), 4.18 (d, 2H, 7-H, *J* = 5.9 Hz), 3.91 (*dd*, 1H, 4-H, *J* = 2.7, 9.2 Hz), 3.41 (s, 2H, 5-H), 1.80–1.71 (*m*, 1H, 2-H), 1.51 (*m*, 1H, 3-H), 1.22 (*m*, 1H, 3-H), 0.92 (*d*, 3H, 1-CH₃, *J* = 2.5 Hz), 0.88 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 2.6 Hz) ppm.

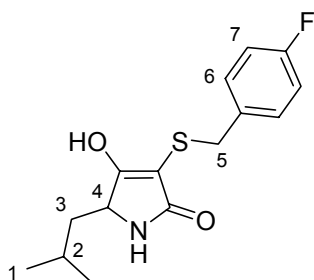
11.4.9 Herstellung von 2-(2,5-Dihydro-4-hydroxy-5-isobutyl-2-oxo-1*H*-pyrrol-3-ylthio)-*N*-isobutylacetamid (**51**)



Ausbeute: 34 mg (38%) von Tetramsäure **51** als gelbes Öl

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.24 (breites s, 1H, Enol), 8.03 (s, 1H, 6-NH), 7.72 (s, 1H, NH), 3.88 (*dd*, 1H, 4-H, *J* = 2.8, 9.1 Hz), 3.76 (*t*, 2H, 7-H, *J* = 6.3 Hz), 3.18 (s, 2H, 5-H), 2.44 (*td*, 1H, 8-H, *J* = 6.7, 13.4 Hz), 1.81–1.73 (*m*, 1H, 2-H), 1.50 (*m*, 1H, 3-H), 1.25 (*m*, 1H, 3-H), 0.94 (*d*, 3H, 1-CH₃, *J* = 2.5 Hz), 0.89 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 2.6 Hz), 0.84 (*d*, 6H, *J* = 6.7 Hz) ppm.

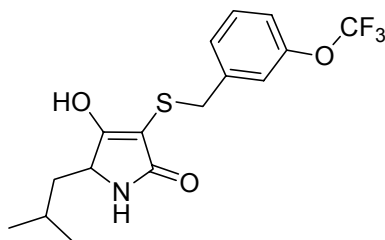
11.4.10 Herstellung von 3-(4-Fluorbenzylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**52**)



Ausbeute: 22 mg (25%) von Tetramsäure **52** als gelbes Öl

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.30 (breites s, 1H, Enol), 7.70 (s, 1H, NH), 7.33 (dd, 2H, 6-H, *J* = 5.7, 8.4 Hz), 7.12 (t, 2H, 7-H, *J* = 8.8 Hz), 4.03 (d, 1H, 4-H, *J* = 3.8 Hz), 3.91-3.84 (*m*, 2H, 5-H), 1.71-1.63 (*m*, 1H, 2-H), 1.42 (*m*, 1H, 3-H), 1.35 (*m*, 1H, 3-H), 0.90 (*d*, 3H, 1-H, *J* = 6.0 Hz), 0.84 (*d*, 3H, 1-H, *J* = 6.1 Hz) ppm.

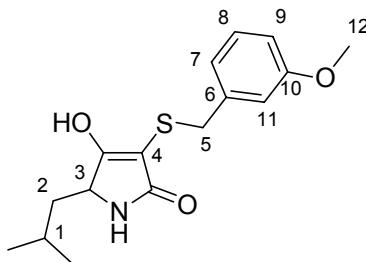
11.4.11 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethoxy)benzylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**53**)



Ausbeute: 38 mg (35%) von Tetramsäure **52** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.12 Herstellung von 3-(3-Methoxybenzylthio)-4-hydroxy-5-isobutyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**54**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 37 mg (40%) Tetramsäure **54** als farbloser Feststoff erhalten.

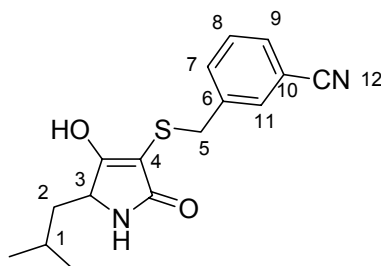
Schmp.: 144°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.29 (breites s, 1H, Enol), 7.70 (s, 1H, NH), 7.15 (t, 1H, 8-H, *J* = 8.0 Hz), 6.79–6.73 (*m*, 3H, 7-H, 9-H, 11-H), 3.86–3.79 (*m*, 3H, 3-H, 5-H), 3.70 (s, 3H, 12-H), 1.75–1.64 (*m*, 1H, 1-H), 1.46 (*ddd*, 1H, 2-H, *J* = 3.3, 9.7, 13.1 Hz), 1.11–0.99 (*m*, 1H, 2-H), 0.84 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 3.8 Hz), 0.82 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 3.9 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 177.1 (C-OH), 171.9 (CONR), 159.0 (10-C), 139.9 (6-C), 129.0 (8-C), 121.1 (7-C), 114.2 (9-C), 112.3 (11-C), 95.0 (4-C), 54.8 (12-C), 54.5 (3-C), 41.6 (5-C), 36.0 (2-C), 24.3, 23.6 (2 CH₃), 21.5 (1-C) ppm.

MS (EI): 307 (27, *M*⁺), 156 (30), 153 (16), 121 (100), 99 (15), 91 (11).

11.4.13 Herstellung von 3-((2,5-Dihydro-4-hydroxy-5-isobutyl-1*H*-pyrrol-3-ylthio)methyl)benzonitril (**55**)



Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 41 mg (45%) Tetramsäure **55** als farbloser Feststoff erhalten.

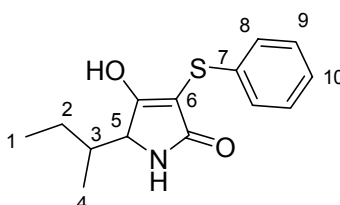
Schmp.: 139°C (EE/*n*-Hexan)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.36 (breites s, 1H, Enol), 7.74 (s, 1H, NH), 7.66 (*d*, 1H, 7-H, *J* = 7.5 Hz), 7.56–7.54 (*m*, 2H, 8-H, 11-H), 7.48 (*d*, 1H, 9-H, *J* = 7.5 Hz), 3.98–3.83 (*m*, 3H, 3-H, 5-H), 1.72–1.63 (*m*, 1H, 1-H), 1.45 (*ddd*, 1H, 2-H, *J* = 3.1, 9.9, 12.9 Hz), 1.11–0.97 (*m*, 1H, 2-H), 0.85 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 2.3 Hz), 0.83 (*d*, 3H, CH₃, *J* = 2.4 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 177.9 (C-OH), 171.8 (CONR), 140.4 (6-C), 133.8 (7-C), 132.2 (11-C), 130.4 (9-C), 129.3 (8-C), 118.7 (12-C), 110.9 (10-C), 94.0 (4-C), 54.5 (3-C), 41.6 (5-C), 35.1 (2-C), 24.2, 23.6 (2 CH_3), 21.5 (1-C) ppm.

MS (EI): 302 (12, M^+), 246 (10), 186 (28), 116 (100), 99 (73), 89 (22).

11.4.14 Herstellung von 5-sec-Butyl-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (56)

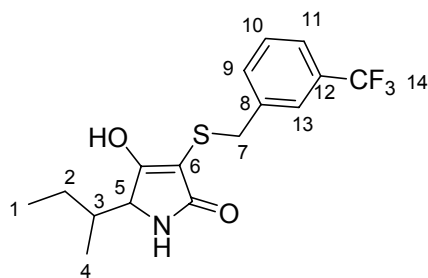


Nach Umkristallisation aus Diethylether werden 21 mg (30%) Tetramsäure **56** als farbloser Feststoff erhalten. (nach ^1H -NMR handelt es sich um ein 1:1 Diastereomerengemisch)

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.71 (s, NH), 7.67 (s, 1H, NH), 7.23–7.17 (m, 2H, 8-H), 7.06–7.03 (m, 3H, 9-H, 10-H), 4.03 (s, 1H, 5-H), 1.85–1.78 (m, 1H, 3-H), 1.45–1.19 (m, 1H, 2-H), 1.07–0.99 (m, 1H, 2-H), 0.92–0.77 (m, 5H, CH_3), 0.63 (d, 1H, CH_3 , J = 6.7 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 178.9 (C-OH), 171.2 (CONR), 136.7 (7-C), 127.9 (8-C), 124.6 (9-C), 124.04 (10-C), 94.0 (6-C), 60.5 (5-C), 34.9 (3-C), 25.6 (2-C), 14.9 (4-C), 11.1 (1-C) ppm.

11.4.15 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-5-sec-butyl-4-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**57**)



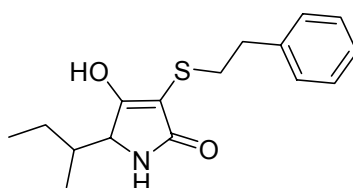
Nach Umkristallisation aus EE werden 28 mg (27%) Tetramsäure **57** als farbloser Feststoff erhalten. (nach $^1\text{H-NMR}$ handelt es sich um ein 1:1 Diastereomerengemisch)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.35 (breites s, 1H, Enol), 7.71–7.49 (*m*, 5H, NH, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.16 (*d*, 5-H, J = 7.0 Hz), 4.13 (*d*, 5-H, J = 7.0 Hz), 3.97–3.81 (*m*, 2H, 7-H), 1.75–1.65 (*m*, 1H, 2-H), 1.38–1.16 (*m*, 1H, 2-H), 0.89–0.67 (*m*, 5H, CH_3), 0.36 (*d*, 1H, CH_3 , J = 6.7 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 175.7 (C-OH), 172.3 (CONR), 140.1 (8-C), 132.8 (9-C), 129.3 (12-C), 128.9 (10-C), 128.6 (11-C), 125.0 (13-C), 123.1 (14-C), 95.1 (6-C), 60.8 (5-C), 59.0 (7-C), 34.7 (3-C), 26.1 (2-C), 15.6 (4-C), 11.3 (1-C) ppm.

MS (EI): 345 (18, M^+), 250 (18), 191 (63), 186 (18), 159 (100), 128 (18), 99 (15), 86 (15).

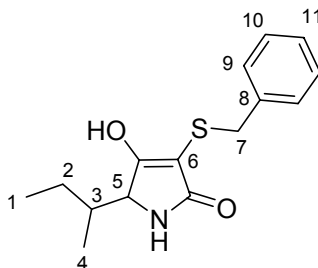
11.4.16 Herstellung von 5-sec-Butyl-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**58**)



Ausbeute: 18 mg (21%) von Tetramsäure **58** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

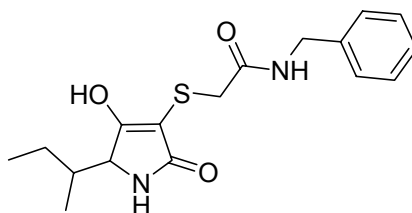
11.4.17 Herstellung von 5-sec-Butyl-3-(benzylthio)-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (**59**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 41 mg (49%) Tetramsäure **59** als farbloser Feststoff erhalten. (nach $^1\text{H-NMR}$ handelt es sich um ein 1:1 Diastereomerengemisch)

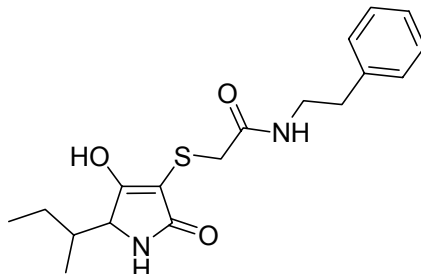
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.19 (breites s, 1H, Enol), 7.57 (s, NH), 7.52 (s, NH), 7.24–7.17 (m, 5H, 9-H, 10-H, 11-H), 4.01 (d, 5-H, J = 2.7 Hz), 3.96 (d, 5-H, J = 2.7 Hz), 3.87–3.79 (m, 2H, 7-H), 1.75–1.66 (m, 1H, 2-H), 1.37–1.14 (m, 1H, 2-H), 0.87–0.82 (m, 3H, CH_3), 0.74–0.69 (m, 2H, CH_3), 0.41 (d, 1H, CH_3 , J = 6.7 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 175.0 (C-OH), 172.2 (CONR), 138.2 (8-C), 128.4 (10-C), 127.7 (9-C), 126.3 (11-C), 95.7 (6-C), 60.6, 58.8 (5-C), 35.6 (7-C), 35.0, 34.6 (3-C), 26.0 (2-C), 15.5 (4-C), 11.4 (1-C) ppm.

11.4.18 Herstellung von 2-(5-sec-Butyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-benzylacetamid (60)

Ausbeute: 25 mg (25%) von Tetramsäure **60** als gelbes Öl

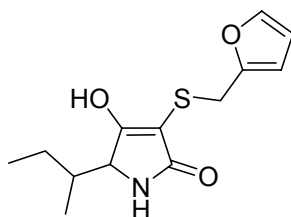
Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.19 Herstellung von 2-(5-sec-Butyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-phenethylacetamid (61)

Ausbeute: 24 mg (23%) von Tetramsäure **61** als farbloser Feststoff

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

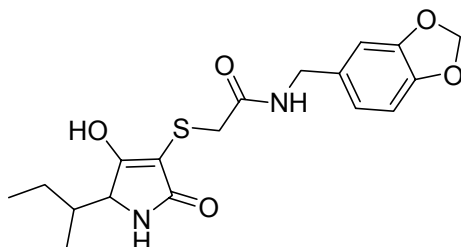
11.4.20 Herstellung von 3-((Furan-2-yl)methylthio)-5-sec-butyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (62)



Ausbeute: 25 mg (31%) von Tetramsäure **62** als braunes Öl

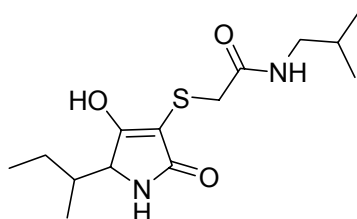
Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.21 Herstellung von 2-(5-sec-Butyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-((benz[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)acetamid (63)



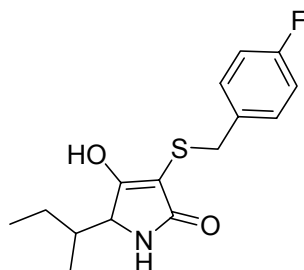
Ausbeute: 51 mg (45%) von Tetramsäure **63** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.22 Herstellung von 2-(5-sec-Butyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-isobutylacetamid (64)

Ausbeute: 24 mg (27%) von Tetramsäure **64** als gelbes Öl

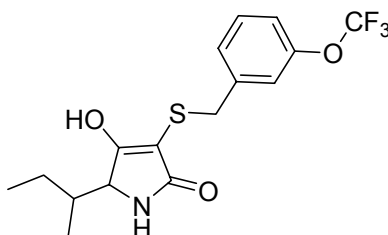
Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.23 Herstellung von 3-(4-Fluorbenzylthio)-5-sec-butyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (65)

Ausbeute: 27 mg (30%) von Tetramsäure **65** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

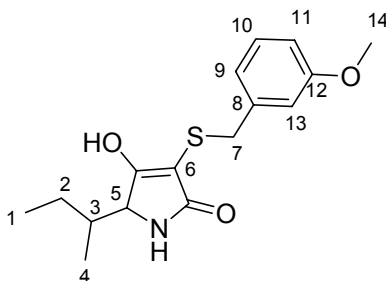
11.4.24 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethoxy)benzylthio)-5-sec-butyl-4-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**66**)



Ausbeute: 38 mg (35%) von Tetramsäure **66** als farbloser Feststoff

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.25 Herstellung von 3-(3-Methoxybenzylthio)-5-sec-butyl-4-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**67**)



Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan/EE werden 30 mg (32%) Tetramsäure **67** als farbloser Feststoff erhalten. (nach $^1\text{H-NMR}$ handelt es sich um ein 1:1 Diastereomerengemisch)

Schmp.: 132°C (*n*-Hexan/EE)

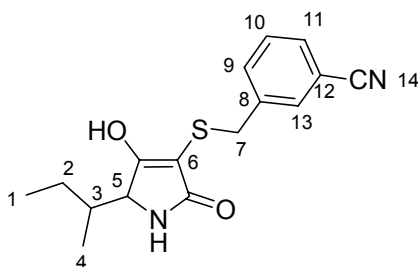
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.22 (breites s, 1H, Enol), 7.53 (s, NH), 7.49 (s, NH), 7.14 (t, 1H, 10-H, J = 7.8 Hz), 6.84–6.72 (m, 3H, 9-H, 11-H, 12-H), 3.97 (d, 5-H, J = 5.1 Hz), 3.93 (d, 5-H, J = 5.1 Hz), 3.87–3.73 (m, 2H, 7-H), 3.71 (s, 3H, 14-H),

1.74–1.65 (*m*, 1H, 3-H), 1.37–1.14 (*m*, 2H, 2-H), 0.87–0.82 (*m*, 3H, CH₃), 0.73–0.68 (*m*, 2H, CH₃), 0.41 (*d*, 1H, CH₃, *J* = 6.7 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.4 (C-OH), 172.7 (CONR), 158.4 (12-C), 140.0 (8-C), 129.1 (10-C), 121.0 (9-C), 114.2 (11-C), 112.3 (13-C), 96.1 (6-C), 61.0, 59.1 (5-C), 54.3 (14-C), 36.0 (7-C), 35.4, 35.0 (3-C), 26.3 (2-C), 15.9 (4-C), 11.9 (1-C) ppm.

MS (EI): 307 (17, *M*⁺), 156 (33), 153 (15), 121 (100), 99 (12), 91 (11).

11.4.26 Herstellung von 3-((5-*sec*-Butyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1*H*-pyrrol-3-ylthio)methyl)benzonitril (**68**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 34 mg (38%) Tetramsäure **68** als farbloser Feststoff erhalten. (nach ¹H-NMR handelt es sich um ein 1:1 Diastereomerengemisch)

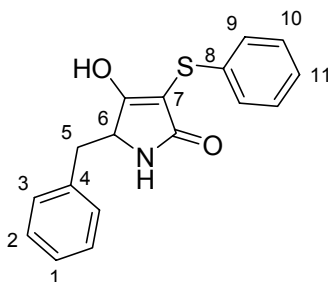
Schmp.: 177°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.27 (breites s, 1H, Enol), 7.67–7.44 (*m*, 5H, NH, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.10 (*d*, 5-H, *J* = 6.1 Hz), 4.08 (*d*, 5-H, *J* = 6.1 Hz), 3.88–3.80 (*m*, 2H, 7-H), 1.71–1.66 (*m*, 1H, 3-H), 1.35–1.23 (*m*, 1H, 2-H), 1.21–1.07 (*m*, 1H, 2-H), 0.87–0.70 (*m*, 5H, CH₃), 0.36 (*d*, 1H, CH₃, *J* = 6.7 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.7 (C-OH), 172.1 (CONR), 140.3 (8-C), 133.5 (9-C), 131.9 (13-C), 130.3 (11-C), 129.0 (10-C), 118.4 (12-C), 110.7 (14-C), 94.7 (6-C), 60.7, 58.8 (5-C), 35.2 (3-C), 34.5 (7-C), 25.9, 21.0 (2-C), 15.4 (4-C), 11.4 (1-C) ppm.

MS (EI): 302 (15, M^+), 186 (44), 116 (100), 99 (80), 89 (24).

11.4.27 Herstellung von 5-Benzyl-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (**69**)



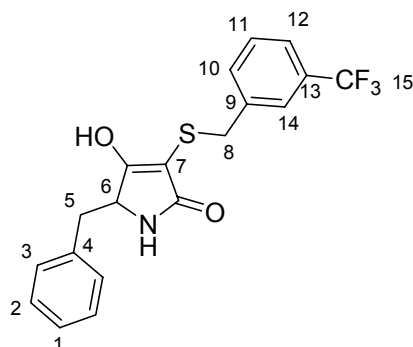
Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 40 mg (45%) Tetramsäure **69** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.22 (breites s, 1H, Enol), 7.82 (s, 1H, NH), 7.29–7.20 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 9-H), 7.06–6.95 (*m*, 3H, 3-H, 11-H), 6.45–6.42 (*m*, 2H, 10-H), 4.43 (*t*, 1H, 6-H, J = 3.8 Hz), 3.11–2.98 (*m*, 2H, 5-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 179.0 (C-OH), 170.8 (CONR), 136.9 (4-C), 135.2 (8-C), 129.9 (9-C), 128.5 (10-C), 127.8 (2-C), 126.5 (3-C), 124.7 (1-C), 124.2 (11-C), 93.5 (7-C), 56.8 (6-C), 35.9 (5-C) ppm.

MS (EI): 297 (100, M^+), 206 (92), 200 (12), 188 (24), 178 (16), 151 (19), 120 (29), 109 (22), 91 (65).

11.4.28 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-5-benzyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (70)



Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 65 mg (57%) Tetramsäure **70** als farbloser Feststoff erhalten.

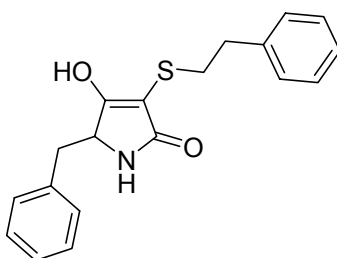
Schmp.: 180°C (*n*-Hexan)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.60 (breites s, 1H, Enol), 7.57–7.38 (*m*, 5H, NH, 2-H, 12-H, 14-H), 7.21–7.11 (*m*, 5H, 1-H, 3-H, 10-H, 11-H), 4.12 (*t*, 1H, 6-H, *J* = 4.8 Hz), 3.76 (*s*, 2H, 8-H), 2.95 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 3.9, 13.1 Hz), 2.66 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 6.2, 13.8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.4 (C-OH), 171.1 (CONR), 139.7 (9-C), 135.8 (4-C), 132.5 (13-C), 129.1 (10-C), 128.8 (2-C), 127.5 (3-C), 126.0 (1-C), 124.8 (15-C), 123.3 (12-C), 95.6 (7-C), 56.3 (6-C), 36.9, 35.5 (5-C) ppm.

MS (EI): 379 (48, *M*⁺), 346 (10), 288 (10), 220 (16), 189 (39), 159 (100), 91 (50).

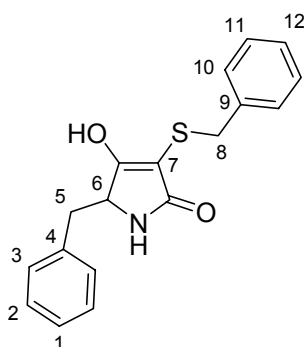
11.4.29 Herstellung von 5-Benzyl-4-hydroxy-3-(phenethylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (71)



Ausbeute: 49 mg (50%) von Tetramsäure **71** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.30 Herstellung von 5-Benzyl-3-(benzylthio)-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (**72**)

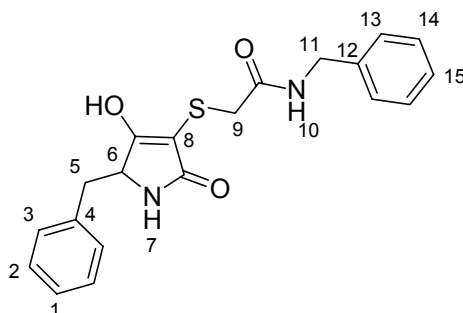


Nach Umkristallisation aus EE werden 42 mg (45%) Tetramsäure **72** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.57 (breites s, 1H, Enol), 7.58 (s, 1H, NH), 7.26–7.14 (*m*, 10H, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.17 (*t*, 1H, 6-H, *J* = 4.6 Hz), 3.66 (s, 2H, 8-H), 2.97 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 4.1, 13.8 Hz), 2.76 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 5.8, 13.8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.3 (C-OH), 170.9 (CONR), 137.5 (9-C), 135.3 (4-C), 128.8 (2-C, 11-C), 127.4 (3-C), 127.0 (10-C), 126.0 (12-C), 125.6 (1-C), 96.9 (7-C), 55.8 (6-C), 36.3 (8-C), 35.7 (5-C) ppm.

11.4.31 Herstellung von 2-(5-Benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-benzylacetamid (73)



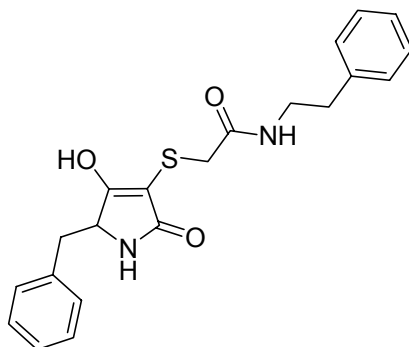
Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 70 mg (63%) Tetramsäure **73** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 134°C (EE/*n*-Hexan)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.62 (breites s, 1H, Enol), 8.94 (s, 0.5H, 10-H), 8.52 (s, 0.5H, 10-H), 7.66 (s, 1H, 7-H), 7.31–7.18 (*m*, 10H, 1-H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H, 15-H), 4.46–4.28 (*m*, 3H, 6-H, 11-H), 3.39–3.19 (*m*, 2H, 9-H), 3.05–2.82 (*m*, 2H, 5-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.6 (C-OH), 170.1 (CONR), 168.5 (CONR), 139.1 (12-C), 138.4 (4-C), 129.5 (2-C), 129.0 (14-C), 128.2 (3-C), 127.6 (13-H), 126.8 (1-C), 126.3 (15-C), 97.1 (8-C), 55.5 (6-C), 42.7 (11-C), 37.9 (9-C), 34.5 (5-C) ppm.

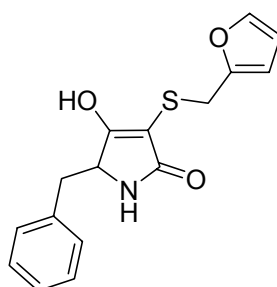
11.4.32 Herstellung von 2-(5-Benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-phenethylacetamid (74)



Ausbeute: 62 mg (54%) von Tetramsäure **74** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

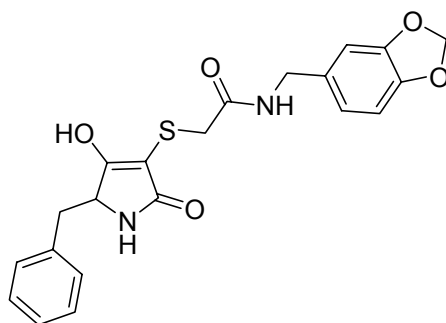
11.4.33 Herstellung von 3-((Furan-2-yl)methylthio)-5-benzyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (**75**)



Ausbeute: 54 mg (60%) von Tetramsäure **75** als braunes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

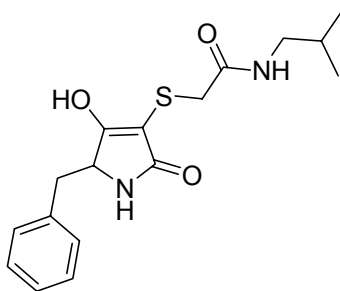
11.4.34 Herstellung von 2-(5-Benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-((benz[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)acetamid (**76**)



Ausbeute: 77 mg (60%) von Tetramsäure **76** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

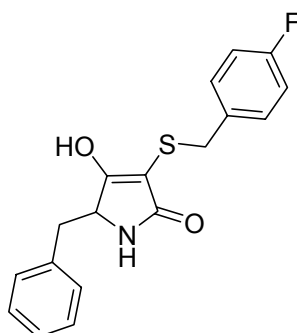
11.4.35 Herstellung von 2-(5-Benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1H-pyrrol-3-ylthio)-N-isobutylacetamid (**77**)



Ausbeute: 55 mg (54%) von Tetramsäure **77** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

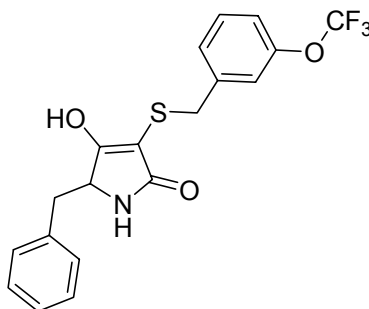
11.4.36 Herstellung von 3-(4-Fluorbenzylthio)-5-benzyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (**78**)



Ausbeute: 35 mg (35%) von Tetramsäure **78** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

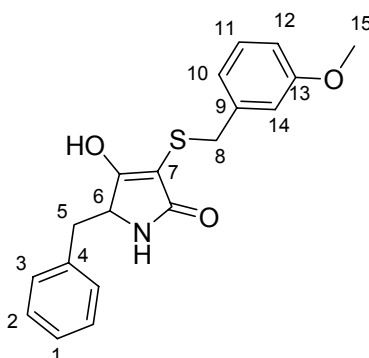
11.4.37 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethoxy)benzylthio)-5-benzyl-4-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (79)



Ausbeute: 47 mg (40%) von Tetramsäure **78** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.38 Herstellung von 3-(3-Methoxybenzylthio)-5-benzyl-4-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (80)



Nach Umkristallisation aus EE werden 43 mg (42%) Tetramsäure **80** als farbloser Feststoff erhalten.

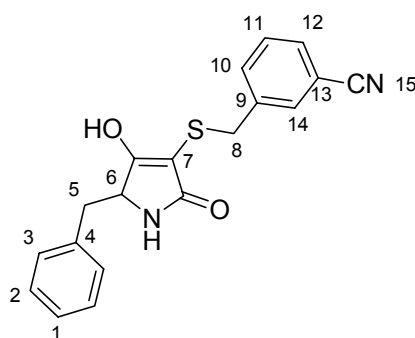
Schmp.: 129°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.80 (breites s, 1H, Enol), 7.53 (s, 1H, NH), 7.24–7.14 (*m*, 6H, 1-H, 2-H, 3-H, 11-H), 6.81–6.72 (*m*, 3H, 10-H, 12-H, 13-H), 4.15 (*t*, 1H, 6-H, *J* = 4.5 Hz), 3.71 (s, 3H, 15-H), 3.65 (*d*, 2H, 8-H, *J* = 3.3 Hz), 3.04–2.95 (*m*, 1H, 5-H), 2.76–2.70 (*m*, 1H, 5-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.2 (C-OH), 171.6 (CONR), 159.2 (13-C), 139.8 (9-C), 136.1 (4-C), 129.5 (2-C, 11-C), 127.8 (3-C), 126.3 (1-C), 121.2 (10-C), 114.4 (12-C), 112.3 (14-C), 96.9 (7-C), 56.6 (6-C), 54.9 (15-C), 37.2 (8-C), 35.3 (5-C) ppm.

MS (EI): 341 (37, *M*⁺), 190 (60), 153 (15), 121 (100), 91 (64).

11.4.39 Herstellung von 3-((5-Benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-1*H*-pyrrol-3ylthio)methyl)benzonitril (**81**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 45 mg (45%) Tetramsäure **81** als farbloser Feststoff erhalten.

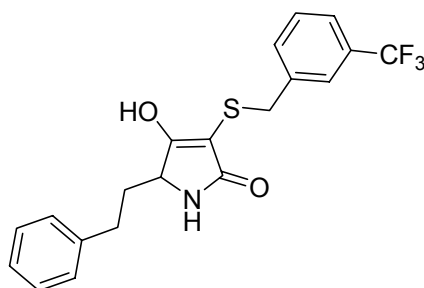
Schmp.: 149°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.66 (breites s, 1H, Enol), 7.68–7.65 (*m*, 1H, NH), 7.56–7.40 (*m*, 4H, 10-H, 11-H, 12-H, 14-H), 7.25–7.14 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 4.16 (*t*, 1H, 6-H, *J* = 4.7 Hz), 3.72 (*d*, 2H, 8-H, *J* = 4.6 Hz), 2.97 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 4.0, 13.8 Hz), 2.71 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 6.1, 13.8 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 175.9 (C-OH), 171.4 (CONR), 140.3 (9-C), 135.1 (4-C), 133.5 (10-C), 132.1 (14-C), 130.3 (12-CH), 129.4 (2-C, 11-C), 127.7 (3-C), 126.2 (1-C), 118.7 (15-C), 110.9 (13-C), 95.9 (7-C), 55.5 (6-C), 37.1 (8-C), 35.7 (5-C) ppm.

MS (EI): 336 (16, M^+), 189 (25), 116 (66), 91 (100).

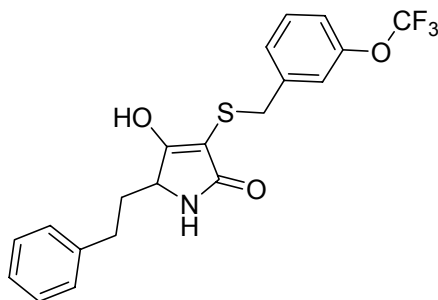
11.4.40 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-5-phenethyl-1H-pyrrol-2(5H)on (**82**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 44 mg (36%) Tetramsäure **82** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

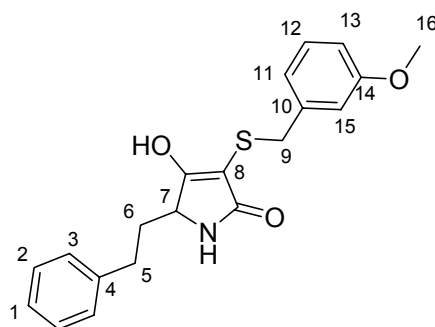
11.4.41 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethoxy)benzylthio)-4-hydroxy-5-phenethyl-1H-pyrrol-2(5H)on (**83**)



Ausbeute: 43 mg (35%) von Tetramsäure **83** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.4.42 Herstellung von 3-(3-Methoxybenzylthio)-4-hydroxy-5-phenethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)on (**84**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 38 mg (38%) Tetramsäure **84** als farbloser Feststoff erhalten.

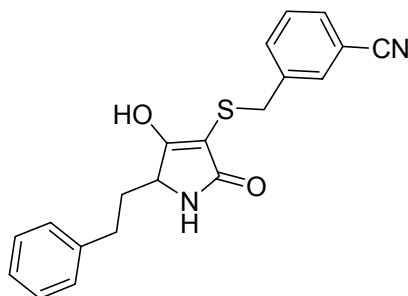
Schmp.: 138°C (EE)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.30 (breites s, 1H, Enol), 7.70 (s, 1H, NH), 7.30–7.25 (*m*, 2H, 2-C), 7.20–7.11 (*m*, 4H, 1-H, 3-H, 12-H), 6.81–6.70 (*m*, 3H, 11-H, 13-H, 15-H), 3.96–3.92 (*m* 1H, 7-H), 3.85–3.81 (*m*, 2H, 9-H), 3.66 (s, 3H, 16-H), 2.43–2.40 (*m*, 2H, 5-H), 1.96–1.86 (*m*, 1H, 6-H), 1.60–1.55 (*m*, 1H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.5 (C-OH), 171.6 (CONR), 158.6 (14-C), 141.0 (10-C), 139.6 (4-C), 128.7 (2-C, 12-C), 127.9 (3-C), 125.4 (1-C), 120.7 (11-C), 113.9 (13-C), 111.6 (15-C), 95.3 (8-C), 55.1 (16-C), 54.4 (7-C) 35.5 (9-C), 33.2 (5-C), 29.7 (6-C) ppm.

MS (EI): 355 (20, *M*⁺), 204 (51), 149 (12), 121 (100), 99 (33), 91 (33).

11.4.43 Herstellung von 3-((2,5-Dihydro-4-hydroxy-2-oxo-5-phenethyl-1H-pyrrol-3-ylthio)methyl)benzonitril (**85**)



Ausbeute: 42 mg (40%) von Tetramsäure **85** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

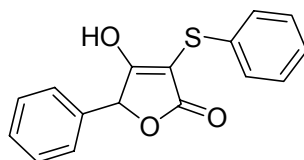
11.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Tetronsäuren **95-100**

Hydroxypolystyren-Harz (**90**, Beladungszahl: 0.98 mmol/g, 400 mg, 0.39 mmol) wird in 4 mL Toluol bei RT für ca. 10 min suspendiert, mit α -Hydroxycarbonsäure (**91/92**, 1.57 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (15 mg, 0.08 mmol) versetzt und am Rückfluss erhitzt. Nach 20 h wird das Harz (**93**) gewaschen (Toluol, DCM, DMF, je 5 x 5 mL), in DMF (3 mL) resuspendiert und mit einer Lösung des Thioessigsäure-Derivats (**29-32**, 1.18 mmol), PyBOP (614 mg, 1.18 mmol), HOBt (181 mg, 1.18 mmol) und DIEA (304 mg, 2.35 mmol) in 2 mL DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für ca. 20 h bei RT geschüttelt, filtriert und gewaschen (DMF, DCM, THF, je 5 mL).

Das Harz **94** wird anschließend in THF (4 mL) suspendiert, mit KOBu^t (53 mg, 0.47 mmol) versetzt und am Rückfluss erhitzt. Nach 1 h wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Harz mit EE (3 x 10 mL) gewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und mit 1N NaOH-Lsg. (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten alkalischen Extrakte werden mit *n*-Hexan (2 x 10 mL) gewaschen, mit 2N HCl-Lsg. auf pH 1-2 gebracht und mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-

Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

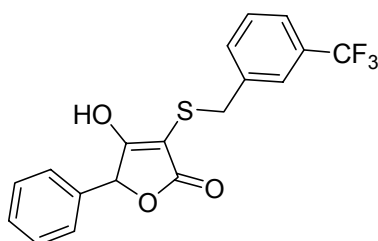
11.5.1 Herstellung von 4-Hydroxy-5-phenyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-on (95)



Nach Umkristallisation aus EE werden 18 mg (17%) Tetronsäure **95** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.5.2 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-5-phenylfuran-2(5H)-on (96)

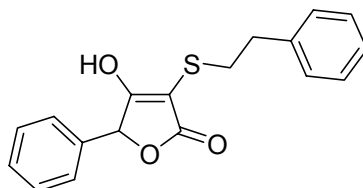


Nach Umkristallisation aus EE werden 19 mg (13%) Tetronsäure **96** als farbloser Feststoff erhalten.

MS (EI): 366 (13, *M*⁺), 348 (76), 320 (9), 280 (13), 248 (13), 159 (100), 109 (9).

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

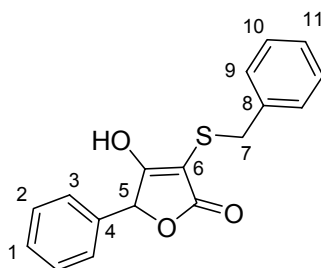
11.5.3 Herstellung von 4-Hydroxy-3-(phenethylthio)-5-phenylfuran-2(5H)-on (**97**)



Ausbeute: 15 mg (12%) von Tetronsäure **97** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.5.4 Herstellung von 3-(Benzylthio)-4-hydroxy-5-phenylfuran-2(5H)-on (**98**)



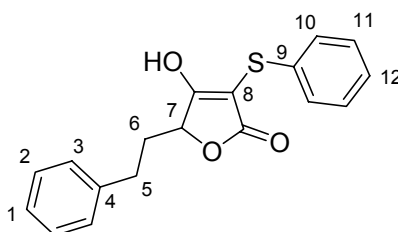
Nach Umkristallisation aus EE werden 20 mg (17%) Tetronsäure **98** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.33–7.28 (*m*, 8H, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H), 7.01–6.98 (*m*, 2H, 9-H), 5.78 (*s*, 1H, 5-H), 4.06–3.92 (*m*, 2H, 7-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 180.4 (C-OH), 171.4 (COOR), 137.5 (4-C), 134.3 (8-C), 128.8 (2-C), 128.6 (10-C), 128.3 (9-C), 128.0 (1-C), 127.1 (3-C), 126.6 (11-C), 89.9 (6-C), 78.8 (5-C), 35.5 (7-C) ppm.

MS (EI): 298 (9, M^+), 280 (16), 91 (100), 77 (11), 65 (19).

11.5.5 Herstellung von 4-Hydroxy-5-phenethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-on (**99**)

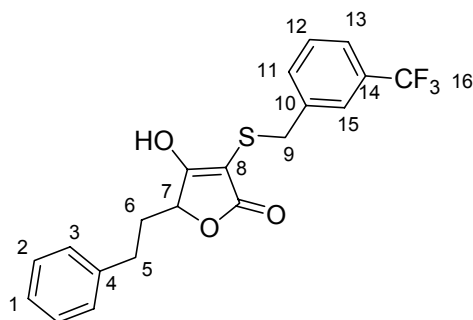


Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 19 mg (15%) Tetronsäure **99** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.33–7.12 (*m*, 10H, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 12-H), 5.01 (*dd*, 1H, 7-H, J = 3.3, 8.2 Hz), 2.71 (*dd*, 2H, 5-H, J = 6.4, 9.3 Hz), 2.26 (*ddt*, 1H, 6-H, J = 3.3, 8.1, 12.4 Hz), 1.99–1.86 (*m*, 1H, 6-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 185.3 (C-OH), 171.3 (COOR), 140.2 (4-C), 135.6 (9-C), 128.7 (10-C, 11-C), 128.1 (2-C, 3-C), 125.8 (12-C), 125.5 (1-C), 87.7 (8-C), 77.1 (7-C), 33.9 (5-C), 29.9 (6-C) ppm.

11.5.6 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-5-phenethyl-furan-2(5H)-on (**100**)



Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 21 mg (13%) Tetransäure **100** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.52–7.45 (*m*, 4H, 2-H, 13-H, 15-H), 7.30–7.11 (*m*, 5H, 1-H, 3-H, 11-H, 12-H), 4.74 (*dd*, 1H, 7-H, *J* = 3.3, 7.9 Hz), 3.99 (*q*, 2H, 8-H, *J* = 13.1 Hz), 2.46–2.39 (*m*, 2H, 5-H), 2.09–1.98 (*m*, 1H, 6-H), 1.59 (*ddt*, 1H, 6-H, *J* = 5.3, 8.0, 9.8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 182.6 (C-OH), 171.8 (COOR), 140.8 (10-C), 139.2 (4-C), 129.4 (11-C, 14-C), 128.6 (2-C), 128.5 (3-C), 126.2 (1-C), 125.6 (15-C, 16-C), 123.8 (13-C), 90.0 (8-C), 77.2 (7-C), 35.6 (9-C), 33.2 (5-C) 30.0 (6-C) ppm.

11.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der *N*-substituierten Tetramsäuren **110-124**

Wang-PS-Harz (**22**, Beladung: 1.1 mmol/g, 300 mg, 0.33 mmol) wird in 3 mL DCM bei RT für ca. 15 min suspendiert, anschließend mit TEA (101 mg, 1 mmol) und einer Lösung von Bromacetylbromid in DCM (**101**, 121 mg, 0.66 mmol, in 1.5 mL DCM) versetzt und bei RT geschüttelt. Nach 2 h wird das Harz (**102**) filtriert und gewaschen (DCM, DMF, DCM, je 5 x 5 mL). Zur Vervollständigung der Reaktion wird das Harz erneut in DCM suspendiert und ein zweites Mal mit TEA (101 mg, 1 mmol) und einer Lösung von Bromacetylbromid in DCM (101, 121 mg, 0.66 mmol, in 1.5 mL DCM)

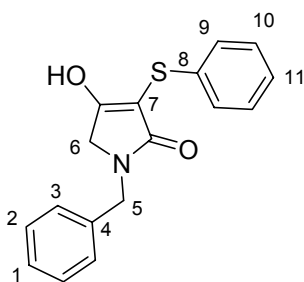
versetzt, für 2 h bei RT geschüttelt, filtriert und gewaschen (DCM, DMF, DCM, je 5 x 5 mL).

Im nächsten Schritt wird das Harz **102** bei RT in DMF suspendiert (4 mL, 5 min) und mit TEA (101 mg, 1 mmol) und Amin (**103-107**, 1 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 20 h bei RT geschüttelt, filtriert und gewaschen (DMF, DCM, DMF, je 5 x 5 mL).

Harz **103** wird anschließend erneut in DMF bei RT (3 mL, 5 min) suspendiert, nun mit einer Lösung von Thioessigsäure-Derivat (**29-33**, 1 mmol), PyBroP (466 mg, 1 mmol) und DIEA (259 mg, 2 mmol) in 2 mL DMF versetzt, bei RT für 20 h geschüttelt, filtriert und gewaschen (DMF, DCM, THF, je 5 x 5 mL).

Abschließend wird das Harz **108** in THF (4 mL) suspendiert mit KO^tBu (45 mg, 0.4 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt. Nach 1 h wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Harz mit EE (3 x 10 mL) gewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und mit 1N NaOH-Lsg. (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten alkalischen Extrakte werden mit *n*-Hexan (2 x 10 mL) gewaschen, mit 2N HCl-Lsg. auf pH 1-2 gebracht und mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

11.6.1 Herstellung von 1-Benzyl-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**110**)

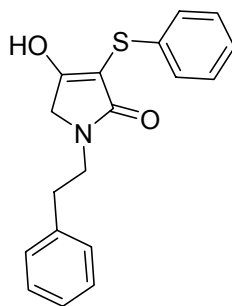


Nach Umkristallisation aus EE werden 13 mg (15%) Tetramsäure **110** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.40 (breites s, 1H, Enol), 7.38–7.33 (*m*, 2H, 9-H), 7.28–7.20 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 10-H); 7.14–7.08 (*m*, 3H, 11-H), 4.52 (s, 2H, 5-H), 3.95 (s, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 176.4 (C-OH), 169.8 (CONR), 137.5 (4-C), 136.8 (8-C), 128.5 (9-C), 128.3 (10-C), 127.1 (2-C), 126.8 (3-C), 125.3 (1-C), 124.6 (11-C), 92.4 (7-C), 49.5 (6-C), 44.8 (5-C) ppm.

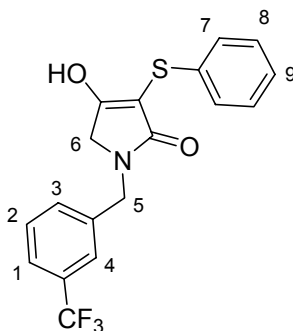
11.6.2 Herstellung von 4-Hydroxy-1-phenethyl-3-(phenylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (111)



Ausbeute: 18 mg (19%) von Tetramsäure **111** als farbloser Feststoff

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.3 Herstellung von 1-(3-(Trifluormethyl)benzyl)-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (112)

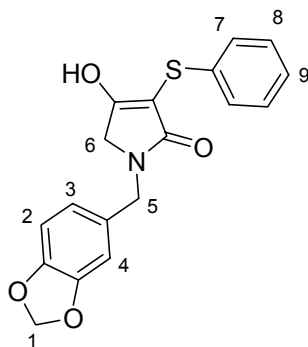


Nach Umkristallisation aus EE werden 40 mg (34%) Tetramsäure **112** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.65–7.52 (*m*, 4H, 1-H, 4-H, 7-H), 7.27–7.22 (*m*, 2H, 8-H), 7.13–7.11 (*m*, 3H, 2-H, 3-H, 9-H), 4.62 (*s*, 2H, 5-H), 4.00 (*s*, 2H, 6-H) ppm.

MS (EI): 365 (93, *M*⁺), 159 (100), 135 (45), 109 (77).

11.6.4 Herstellung von 1-((Benz[*d*][1,3]dioxol-5-yl)methyl)-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**113**)

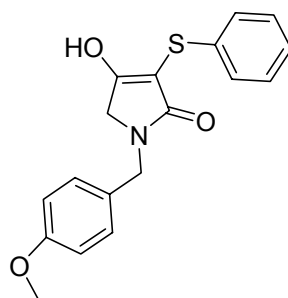


Nach Umkristallisation aus EE werden 15 mg (15%) Tetramsäure **113** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.40 (breites *s*, 1H, Enol), 7.29–7.24 (*m*, 2H, 7-H), 7.14–7.11 (*m*, 3H, 8-H, 9-H), 6.88 (*d*, 1H, 2-H, *J* = 7.9 Hz), 6.78 (*d*, 1H, 4-H, *J* = 1.3 Hz), 6.72 (*dd*, 1H, 3-H, *J* = 1.3, 7.9 Hz), 6.00 (*s*, 2H, 1-H), 4.40 (*s*, 2H, 5-H), 3.90 (*s*, 2H, 6-H) ppm.

MS (EI): 341 (13, *M*⁺), 232 (85), 135 (100), 109 (14), 77 (24).

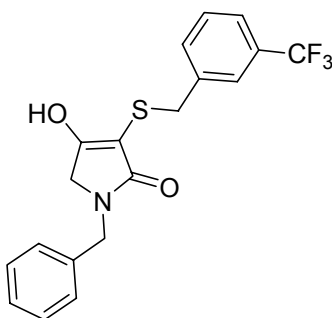
11.6.5 Herstellung von 1-(4-Methoxybenzyl)-4-hydroxy-3-(phenylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (114)



Ausbeute: 14 mg (14%) von Tetramsäure **114** als farbloser Feststoff

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

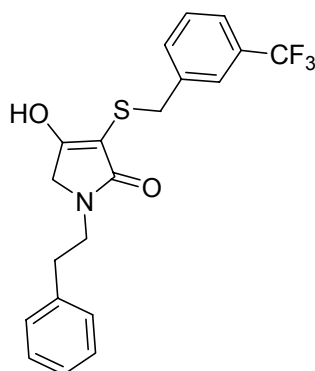
11.6.6 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-1-benzyl-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (115)



Ausbeute: 18 mg (16%) von Tetramsäure **115** als farbloser Feststoff

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

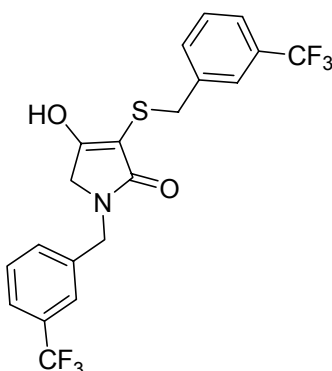
11.6.7 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-1-phenethyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (116)



Ausbeute: 15 mg (13%) von Tetramsäure **116** als gelbes Öl

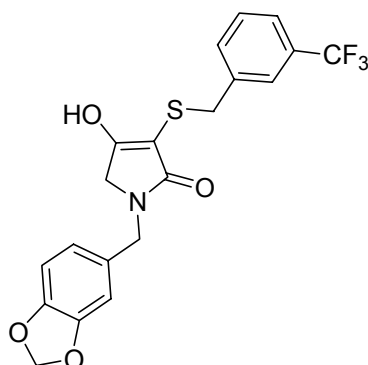
Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.8 Herstellung von 1-(3-(Trifluormethyl)benzyl)-3-(3-(trifluormethyl)benzylthio)-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (117)



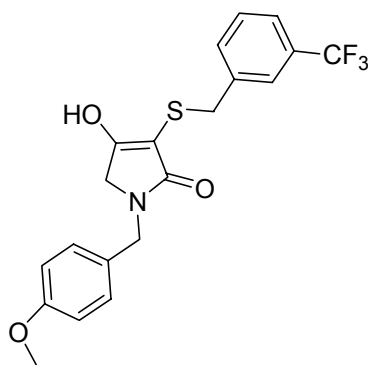
Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 17 mg (13%) Tetramsäure **117** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.9 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-1-((benz[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (118)

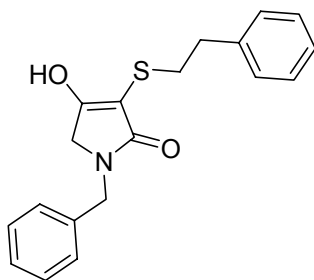
Ausbeute: 23 mg (18%) von Tetramsäure **118** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.10 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)-1-(4-methoxybenzyl)-4-hydroxy-1H-pyrrol-2(5H)-on (119)

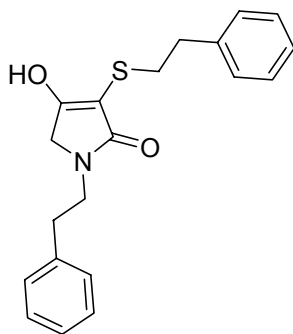
Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 12 mg (10%) Tetramsäure **119** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.11 Herstellung von 1-Benzyl-4-hydroxy-3-(phenethylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (120)

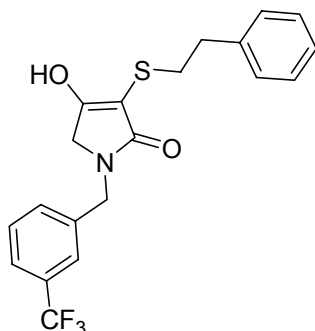
Ausbeute: 14 mg (14%) von Tetramsäure **120** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.12 Herstellung von 4-Hydroxy-1-phenethyl-3-(phenethylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (121)

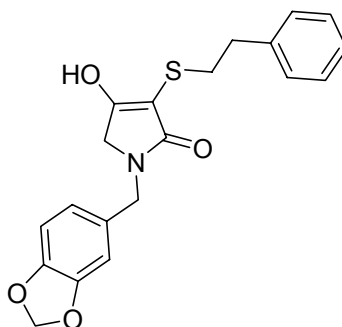
Ausbeute: 12 mg (12%) von Tetramsäure **121** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.13 Herstellung von 1-(3-(Trifluormethyl)benzyl)-4-hydroxy-3-(phenethylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (122)

Ausbeute: 18 mg (15%) von Tetramsäure **122** als gelbes Öl

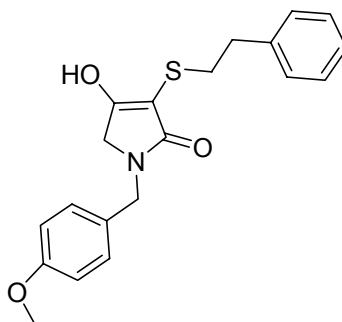
Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.14 Herstellung von 1-((Benz[*d*][1,3]dioxol-5-yl)methyl)-4-hydroxy-3-(phenethylthio)-1H-pyrrol-2(5H)-on (123)

Ausbeute: 14 mg (13%) von Tetramsäure **123** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

11.6.15 Herstellung von 1-(4-Methoxybenzyl)-4-hydroxy-3-(phenethylthio)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**124**)

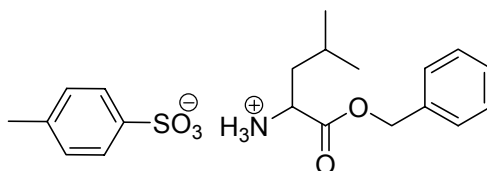


Ausbeute: 13 mg (12%) von Tetramsäure **124** als gelbes Öl

Die Substanz wurde in *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490 veröffentlicht. Weitere analytische Daten können dem entsprechenden Pdf-File *supporting material* entnommen werden.

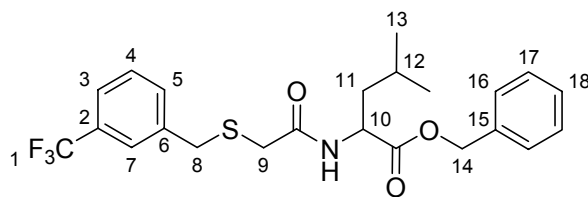
11.7 Synthese der Sulfotetramsäuren **131** und **132**

11.7.1 Herstellung von *H*-Leu-OBzl-*p*-tosylat (**127**)



D,L-Leucin (**125**, 262.4 mg, 2 mmol) wird in 10 mL Toluol gelöst/suspendiert, mit *p*-Toluolsulfonsäure (457 mg, 2.4 mmol) und Benzylalkohol (**126**, 3.46 g, 32 mmol) versetzt und über einem Wasserabscheider erhitzt. Nach 14 h wird der Ansatz auf RT abgekühlt, mit Diethylether versetzt und im Kühlschrank gelagert bis ein farbloser Feststoff ausfällt. Nach Filtration und Trocknen im Hochvakuum werden 732 mg (93%) *H*-Leu-OBzl-*p*-tosylat **127** als farbloser Feststoff erhalten.

11.7.2 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(trifluormethyl)benzylthio)-acetamid)-4-methylpentanoat (**128**)



2-(3-(Trifluormethyl)benzylthio)essigsäure (**30**, 375 mg, 1.5 mmol) wird in DCM gelöst (5 mL), mit EDAC (288 mg, 1.5 mmol) und HOBt-Hydrat (276 mg, 1.8 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden *H*-Leu-OBzl-*p*-Tosylat (**127**, 610 mg, 1.55 mmol) und TEA (228 mg, 2.25 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 20 mL DCM aufgenommen, mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (CHCl₃) aufgereinigt, so dass 377 mg (55%) von Amid **128** als farbloses Öl erhalten werden.

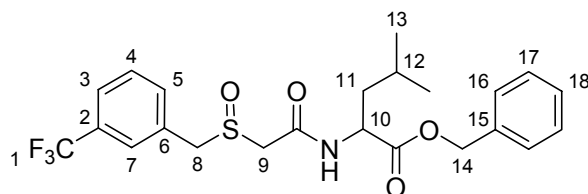
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.58–7.36 (*m*, 9H, 3-H, 4-H, 5-H, 7-H, 16-H, 17-H, 18-H), 7.04 (*d*, 1H, NH, *J* = 8.5 Hz), 5.19 (*d*, 2H, 14-H, *J* = 4.5 Hz), 4.72–4.64 (*m*, 1H, 10-H), 3.78 (*s*, 2H, 8-H), 3.12 (*s*, 2H, 9-H), 1.76–1.66 (*m*, 2H, 11-H), 1.63–1.54 (*m*, 1H, 12-H), 0.94 (*d*, 6H, 13-H, *J* = 6.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 172.7 (COOR), 168.3 (CONR), 138.0 (15-C), 135.4 (6-C), 132.6 (5-C), 131.8 (2-C), 129.5 (4-C, 17-C), 128.7 (7-C, 16-C, 18-C), 125.9 (1-C), 124.4 (3-C), 67.3 (14-C), 51.2 (10-C), 41.3 (9-C), 36.1 (11-C), 35.0 (8-C), 25.1 (12-C), 22.9, 21.9 (13-C) ppm.

11.7.3 Oxidation von **128** mit *m*CPBA

Amid **128** (377 mg, 0.83 mmol) wird in DCM (2 mL) gelöst und bei -50°C tropfenweise mit einer Lösung von *m*CPBA (217 mg, 1.26 mmol) in DCM (1 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei -50°C für 1 h gerührt, anschließend auf RT erwärmt, in 5 mL DCM aufgenommen, mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, EE) werden 115 mg (30%) Sulfonoxid **129** und 235 mg (58%) Sulfon **130** als farblose Feststoffe erhalten.

11.7.3.1 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(Trifluormethyl)-benzylsulfinyl)-acetamid)-4-methylpentanoat (**129**)

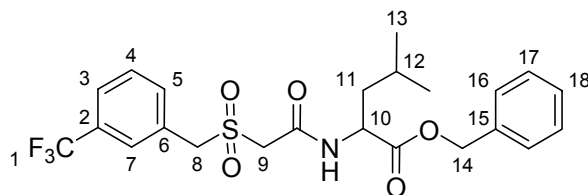


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.63–7.61 (*m*, 2H, 3-H, 7-H), 7.55–7.50 (*m*, 2H, 4-H, 5-H), 7.35–7.34 (*m*, 5H, 16-H, 17-H, 18-H), 7.14 (*d*, 1H, NH, *J* = 7.7 Hz), 5.19 (*dd*, 2H, 14-H, *J* = 4.0, 8.2 Hz), 4.69–4.62 (*m*, 1H, 10-H), 4.26 (*dd*, 2H, 8-H, *J* = 12.4, 54.8 Hz), 3.46 (*ddd*, 2H, 9-H, *J* = 14.9, 41.4, 67.8 Hz), 1.75–1.63 (*m*, 3H, 11-H, 12-H), 0.94 (*td*, 6H, 13-H, *J* = 2.5, 4.9 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 172.4 (COOR), 164.3 (CONR), 135.1 (15-C), 133.7 (5-C), 130.5 (2-C), 130.2 (4-C), 129.4 (17-C), 128.4 (7-C), 126.9 (16-C, 18-C), 125.3 (3-C, 6-C), 121.8 (1-C), 67.1 (14-C), 55.4 (8-C), 52.6 (10-C), 51.4 (9-C), 40.5 (11-C), 24.8 (12-C), 22.7, 21.4 (13-C) ppm.

ESI-MS: *m/z* 492.1 ((M+Na)⁺)

11.7.3.2 Herstellung von Benzyl-2-(2-(3-(Trifluormethyl)-benzylsulfonyl)-acetamid)-4-methylpentanoat (130)

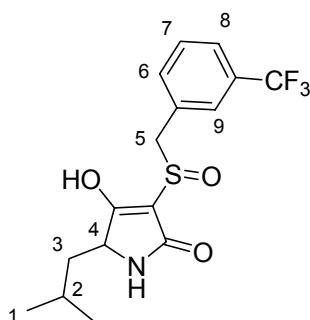


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.76 (s, 1H, 7-H), 7.69–7.66 (m, 2H, 3-H, 5-H), 7.52 (t, 1H, 4-H, J = 7.8 Hz), 7.36–7.34 (m, 5H, 16-H, 17-H, 18-H), 7.00 (d, 1H, NH, J = 8.0 Hz), 5.19 (d, 2H, 14-H, J = 3.0 Hz), 4.70–4.62 (m, 1H, 10-H), 4.52 (d, 2H, 8-H, J = 2.3 Hz), 3.80 (q, 2H, 9-H, J = 14.7 Hz), 1.73–1.60 (m, 3H, 11-H, 12-H), 0.93 (d, 6H, 13-H, J = 5.9 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 172.4 (COOR), 161.6 (CONR), 135.3 (15-C), 134.9 (5-C), 131.8 (2-C), 129.7 (4-C), 128.9 (17-C), 128.7 (7-C), 128.5 (16-C), 128.4 (18-C), 128.3 (3-C), 126.3 (6-C), 126.2 (1-C), 67.6 (14-C), 58.6 (8-C), 57.1 (9-C), 51.9 (10-C), 40.8 (11-C), 25.0 (12-C), 23.0, 21.8 (13-C) ppm.

ESI-MS: m/z 408.2 ((M+Na) $^+$)

11.7.4 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylsulfinyl)-4-hydroxy-5-isobutyl-1H-pyrrol-2(5H)-on (131)

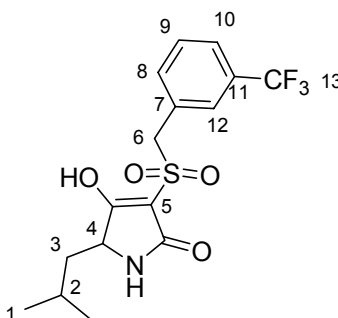


Sulfoxid **129** (115 mg, 0.25 mmol) wird in 3 mL THF gelöst, mit KOBU^t (34 mg, 0.3 mmol) versetzt und am Rückfluss erhitzt. Nach 1 h wird der Ansatz auf RT abgekühlt, in 10 mL EE aufgenommen und mit 1N NaOH-Lsg. extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten alkalischen Phasen werden mit *n*-Hexan gewaschen (2 x 10 mL), mit 2N

HCl-Lsg. auf pH 1-2 gebracht und mit EE (3 x 10 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation des Rohproduktes aus EE/*n*-Hexan werden 54 mg (68%) der Sulfotetramsäure **132** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.04 (s, 1H, NH), 7.66–7.59 (m, 4H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 4.78 (ddd, 1H, 4-H, *J* = 11.6, 37.5, 28.2 Hz), 3.85 (m, 2H, 5-H), 1.78–1.60 (m, 1H, 2-H), 1.45 (td, 1H, 3-H, *J* = 10.5, 21.5 Hz), 1.19–1.07 (m, 1H, 3-H), 0.85 (d, 3H, CH₃, *J* = 6.5 Hz); 0.77 (d, 3H, CH₃, *J* = 6.3 Hz) ppm.

11.7.5 Herstellung von 3-(3-(Trifluormethyl)benzylsulfonyl)-4-hydroxy-5-isobutyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on (**132**)



Sulfon **130** (235 mg, 0.58 mmol) wird in 3 mL THF gelöst, mit KOBu^t (78 mg, 0.7 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt. Nach 1 h wird der Ansatz auf RT abgekühlt, in 15 mL EE aufgenommen und mit 1N NaOH-Lsg. extrahiert (3 x 15 mL). Die vereinigten alkalischen Phasen werden mit *n*-Hexan gewaschen (2 x 15 mL), mit 2N HCl-Lsg. auf pH 1-2 gebracht und mit EE (3 x 15 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation des Rohproduktes aus EE/*n*-Hexan werden 131 mg (60%) der Sulfotetramsäure **132** als farbloser Feststoff erhalten.

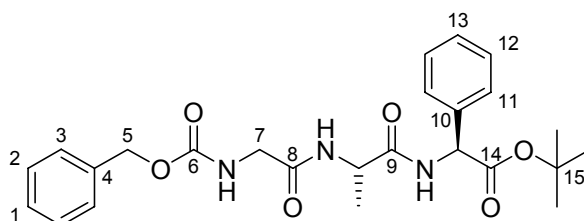
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.71 (d, 1H, NH, *J* = 4.9 Hz), 7.61–7.58 (m, 4H, 8-H, 9-H, 10-H, 12-H), 4.65 (dd, 2H, 6-H, *J* = 13.7, 32.7), 3.95 (dd, 1H, 4-H, *J* = 2.9,

9.9 Hz), 1.73–1.64 (*m*, 1H, 2-H), 1.47 (*ddd*, 1H, 3-H, *J* = 3.0, 9.9, 12.9 Hz), 1.07–0.98 (*m*, 1H, 3-H), 0.82 (*d*, 6H, 1-H, *J* = 6.5 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 182.8 (C-OH), 167.9 (CONR), 134.7 (7-C), 130.8 (8-C), 129.3 (11-C), 128.6 (9-C), 126.8 (12-C), 124.8 (13-C), 122.2 (10-C), 99.8 (5-C), 58.4 (6-C), 55.5 (4-C), 40.9 (3-C), 24.0 (2-C), 23.2, 21.0 (1-C) ppm.

11.8 Synthese von DiazoDAPT 144

11.8.1 Herstellung von Z-Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (146)



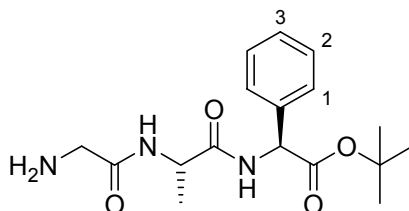
Z-Gly-Ala-OH (**147**, 280 mg, 1 mmol) wird in DCM gelöst (10 mL), mit EDAC (192 mg, 1 mmol) und HOBt-Hydrat (184 mg, 1.2 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden Phg-O(*t*-Bu)-HCl (**148**, 219 mg, 0.9 mmol) und TEA (152 mg, 1.5 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 20 mL DCM aufgenommen, mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum werden 412 mg (97%) von Z-Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) **146** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.63 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.0 Hz), 8.01 (*d*, 1H, Ala-NH, *J* = 7.7 Hz), 7.46–7.41 (*m*, 1H, Gly-NH), 7.39–7.31 (*m*, 10H, 1-H, 2-H, 3-H, 11-H, 12-H, 13-H), 5.22 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 5.02 (*s*, 2H, 5-H), 4.51–4.41 (*m*, 1H, α Ala-CH), 3.62 (*dd*, 2H, 7-H, *J* = 2.4, 6.0 Hz), 1.34 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.25 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.8 (14-COOR), 169.0 (9-CONR), 168.2 (7-CONR), 156.1 (6-COOR), 136.7 (4-C), 135.9 (10-C), 128.2 (11-C), 128.0 (12-C),

127.9 (1-C), 127.4 (13-C), 127.3 (2-C, 3-C), 80.7 (15-C), 65.0 (5-C), 56.8 (Phg-CH), 47.2 (Ala-CH), 43.0 (7-C), 27.1 (*t*-Bu), 18.2 (Ala-CH₃) ppm.

11.8.2 Herstellung von Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**147**)

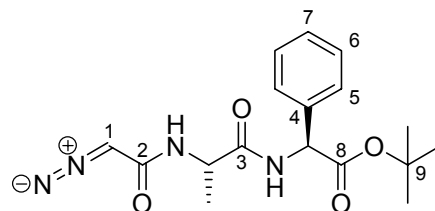


Z-Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**146**, 412 mg, 0.88 mmol) wird in 10 mL EtOH gelöst und mit Palladium auf aktivierter Kohle (Degussa Typ E101, 150 mg) versetzt. Der Kolben wird evakuiert, mit H₂ gefüllt und bei RT gerührt. Nach 150 min wird die Suspension filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 302 mg (90%) von Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) **147** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.76 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.0 Hz), 8.10 (*d*, 1H, Ala-NH, *J* = 7.7 Hz), 7.44–7.40 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 5.28 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 4.55–4.51 (*m*, 1H, α Ala-CH), 3.12 (*s*, 2H, Gly-CH₂), 1.40 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.31 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.0 Hz) ppm.

11.8.3 Herstellung von DiazoDAPT (**144**)



Gly-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**147**, 302 mg, 0.9 mmol) wird in 5 mL CHCl₃ gelöst, mit *tert*-Butylnitrit (111 mg, 1.08 mmol) und Essigsäure (13.5 mg, 0.22 mmol) versetzt und für ca. 20 min unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, in 10 mL CHCl₃ aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 20 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom

Lösungsmittel befreit. Nach Kristallisation aus Diethylether werden 140 mg (45%) von DiazoDAPT **144** als gelber Feststoff erhalten.

Schmp.: 160–162 °C (Diethylether)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.63 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.0 Hz), 7.83 (*d*, 1H, Ala-NH, *J* = 7.8 Hz), 7.40–7.35 (*m*, 5H, 5-H, 6-H, 7-H), 5.36 (*s*, 1H, 1-H), 5.22 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 4.54–4.45 (*m*, 1H, α Ala-CH), 1.33 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.23 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.0 Hz) ppm.

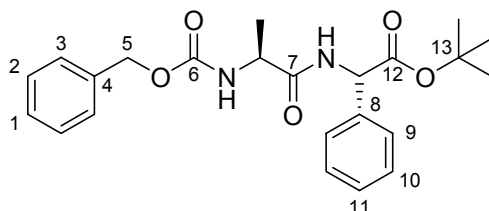
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.0 (8-COOR), 169.0 (3-CONR), 164.2 (2-CONR), 136.0 (4-C), 128.2 (5-C), 127.8 (6-C), 127.3 (7-C), 80.7 (9-C), 56.7 (Phg-CH), 47.6 (Ala-CH), 45.8 (1-C), 27.1 (*t*-Bu), 18.4 (Ala-CH₃) ppm.

IR (CHCl₃): 2105 cm⁻¹ (N₂C)

C₁₇H₂₂N₄O₄: (346.38) ber.: C 59.0 H 6.4 N 16.2
gef.: C 58.7 H 6.4 N 15.6

11.9 Synthese von DAPT (13)

11.9.1 Herstellung von Z-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (157)



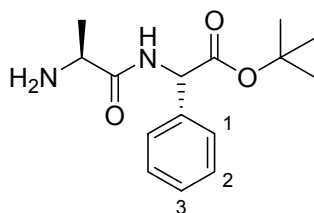
Z-L-Alanin (**156**, 890 mg, 3.99 mmol) wird in 40 mL DCM gelöst, mit EDAC (764 mg, 3.99 mmol) und HOBT-Hydrat (732 mg, 4.78 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden Phg-O(*t*-Bu)-HCl (**148**, 874 mg, 3.6 mmol) und TEA (1.1 mL, 7.93 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 80 mL DCM aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-

Lsg. (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknung im HV erhält man 1.23 g (75%) von Z-Ala-Phg-O(*t*-Bu) **157** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.52 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.4 Hz), 8.47 (*d*, 1H, Ala-NH, *J* = 7.0 Hz), 7.42–7.33 (*m*, 10H, 1-H, 2-H, 3-H, 9-H, 10-H, 11-H), 5.26 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.3 Hz), 5.32 (*s*, 2H, 5-H), 4.41–4.37 (*m*, 1H, α Ala-CH), 1.35 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.11 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175.0 (12-COOR), 169.3 (7-CONR), 164.7 (6-COOR), 138.7 (4-C), 136.9 (8-C), 128.5 (9-C), 128.0 (11-C), 127.9 (2-C), 127.4 (1-C), 127.0 (3-C, 10-C), 81.2 (13-C), 65.8 (5-C), 56.5 (Phg-CH), 52.2 (Ala-CH), 27.6 (*t*-Bu), 19.5 (Ala-CH₃) ppm.

11.9.2 Herstellung von Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**158**)

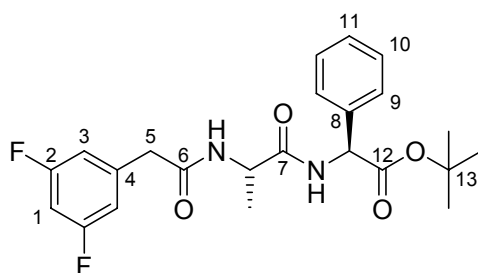


Z-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**157**, 1.23 g, 2.98 mmol) wird in 20 mL EtOH gelöst und mit Palladium auf aktivierter Kohle (Degussa Typ E101, 150 mg) versetzt. Der Kolben wird evakuiert, mit H₂ gefüllt und bei RT gerührt. Nach 150 min wird die Suspension filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 747 mg (90%) von Ala-Phg-O(*t*-Bu) **158** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.50 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.3 Hz), 7.41–7.37 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 5.22 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.3 Hz); 4.38–4.35 (*m*, 1H, α Ala-CH), 1.33 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.13 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.2 Hz) ppm.

11.9.3 Herstellung von DAPT (13)



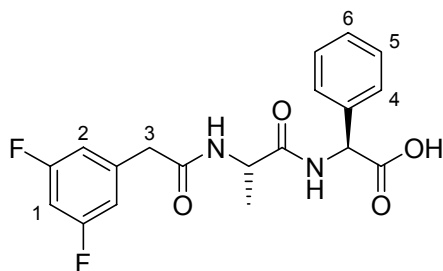
3,5-Difluor-phenyl-essigsäure (**159**, 620 mg, 3.6 mmol) wird in 20 mL DCM gelöst, mit EDAC (690 mg, 3.6 mmol) und HOBt-Hydrat (661 mg, 4.3 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden H-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**158**, 670 mg, 2.4 mmol) und TEA (615 μ L, 4.8 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 60 mL DCM aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknung im HV erhält man 727 mg (70%) von DAPT **13** als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.48 (*d*, 1H, Phg-NH, J = 7.0 Hz), 8.32 (*d*, 1H, Ala-NH, J = 7.1 Hz), 7.42–7.33 (*m*, 5H, 9-H, 10-H, 11-H), 7.06 (*m*, 1H, 1-H), 7.00–6.93 (*m*, 2H, 3-H), 5.44 (*d*, 1H, α Phg-H, J = 7.0 Hz), 4.61–4.58 (*m*, 1H, α Ala-CH), 3.54 (*s*, 2H, 5-H), 1.40 (*s*, 9H, *t*-Bu), 1.21 (*d*, 3H, Ala- CH_3 , J = 7.0 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 172.5 (12-COOR), 171.3 (7-CONR), 170.8 (6-CONR), 164.8 (2-C), 138.1 (4-C), 136.9 (8-C), 129.0 (9-C), 128.8 (10-C), 127.4 (11-C), 112.1 (3-C), 103.4 (1-C), 81.0 (13-C), 56.3 (Phg-CH), 50.2 (Ala-CH), 41.4 (5-C), 27.8 (*t*-Bu), 18.5 (Ala- CH_3) ppm.

11.10 Synthese der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate 149-153

11.10.1 Herstellung von DAPA (160)



DAPT (**13**, 727 mg, 1.68 mmol) wird in DCM (25 mL) gelöst. Nach Zugabe von TFA (4 mL) wird bei RT 7 h gerührt und anschließend DCM und TFA im Vakuum entfernt. Man erhält ein gelbes Öl, welches auf Zugabe von Diethylether einen farblosen Niederschlag bildet. Der Niederschlag wird filtriert, mit Diethylether gewaschen und am HV getrocknet.

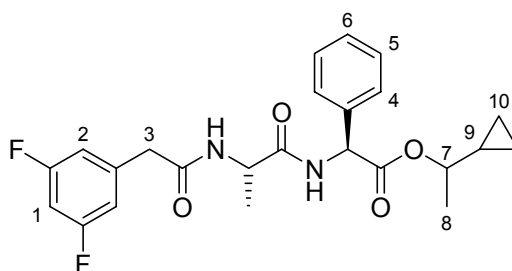
Ausbeute: 537 mg (85%) von DAPA **160** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.60 (*d*, 1H, Phg-NH, *J* = 7.4 Hz), 8.36 (*d*, 1H, Ala-NH, *J* = 7.6 Hz), 7.39–7.32 (*m*, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 7.08 (*m*, 1H, 1-H), 7.01–6.95 (*m*, 2H, 2-H), 5.31 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.4 Hz), 4.44 (*q*, 1H, α Ala-CH, *J* = 7.2 Hz), 3.51 (*s*, 2H, 3-H), 1.25 (*d*, 3H, Ala-CH₃, *J* = 7.0 Hz) ppm.

11.10.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der am C-Terminus veränderten DAPT-Derivate 149-153

DAPA (**160**, 263 mg, 0.7 mmol) wird in 20 mL DCM gelöst, mit EDAC (134 mg, 0.7 mmol) und HOBt-Hydrat (129 mg, 0.84 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden Alkohol (**161-164**, 0.7 mmol) bzw. Amin (**165**, 0.7 mmol) und TEA (154 μ L, 1.1 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 30 mL DCM aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende gelbe Öl wird mittels Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, *n*-Hexan/EE 1:1) aufgereinigt.

11.10.2.1 Herstellung von (S)-1-Cyclopropylethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (149)

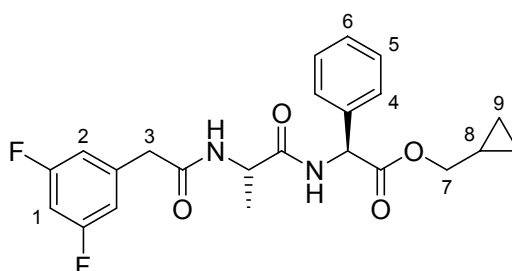


Ausbeute: 72 mg (23%) von **149** als gelbes Öl (1:1 Gemisch der Diastereomere)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.35–7.26 (*m*, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 6.83–6.71 (*m*, 3H, 1-H, 2-H), 5.46 (*dd*, 1H, α Phg-H, *J* = 6.9, 5.8 Hz), 4.62–4.47 (*m*, 1H, α Ala-CH), 4.24–4.11 (*m*, 1H, 7-H), 3.55–3.47 (*m*, 2H, 3-H), 1.39–1.37 (*m*, 3H, Ala-CH₃), 1.33–1.30 (*m*, 3H, 8-H), 0.92–0.83 (*m*, 1H, 9-H), 0.44–0.42 (*m*, 2H, 10-H), 0.12 – 0.11 (*m*, 2H, 10-H) ppm.

MS (EI): 444 (22, *M*⁺), 331 (26), 127 (26), 106 (100), 44 (63).

11.10.2.2 Herstellung von (S)-Cyclopropylmethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (150)



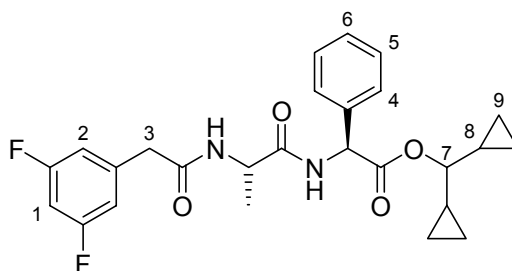
Ausbeute: 84 mg (28%) von **150** als farbloses Öl

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.33–7.31 (*m*, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 6.83–6.70 (*m*, 3H, 1-CH, 2-CH), 5.52–5.44 (*m*, 1H, α Phg-H), 4.61–4.51 (*m*, 1H, α Ala-CH), 4.22–4.10

(*m*, 2H, 7-H), 3.52–3.46 (*m*, 2H, 3-H), 1.39–1.37 (*m*, 3H, Ala-CH₃), 0.98–0.85 (*m*, 1H, 8-H), 0.42–0.40 (*m*, 2H, 9-H), 0.13–0.11 (*m*, 2H, 9-H) ppm.

MS (EI): 430 (31, *M*⁺), 331 (42), 127 (32), 106 (100), 44 (87).

11.10.2.3 Herstellung von (S)-Dicyclopropylmethyl-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid)-2-phenylacetat (151)

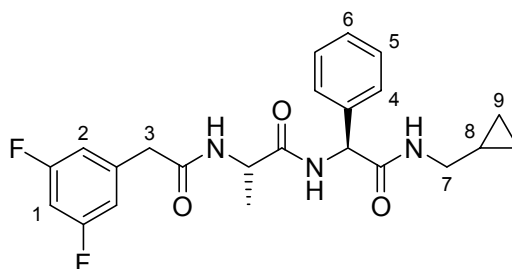


Ausbeute: 125 mg (38%) von **151** als farbloses Öl

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.41–7.23 (*m*, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 6.81–6.70 (*m*, 3H, 1-H, 2-H), 5.51 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.1 Hz), 5.11–5.08 (*m*, 1H, α Ala-CH), 4.19–4.12 (*m*, 2H, 7-H), 3.52–3.46 (*m*, 2H, 3-H), 1.38–1.26 (*m*, 3H, Ala-CH₃), 1.00–0.95 (*m*, 2H, 8-H), 0.52–0.45 (*m*, 4H, 9-H), 0.18–0.15 (*m*, 4H, 9-H) ppm.

MS (EI): 470 (22, *M*⁺), 453 (20), 331 (20), 91 (100), 44 (84).

11.10.2.4 Herstellung von (2S)-N-((S)-(Cyclopropyl-methyl-carbamoyl)-phenylmethyl)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid (152)

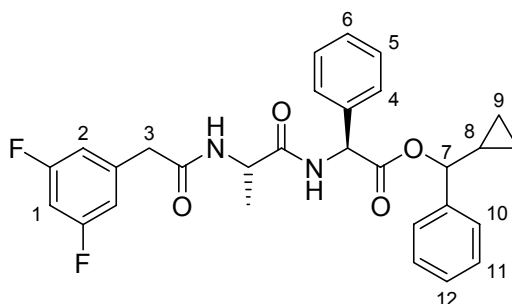


- nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift von 11.10.2 konnten lediglich Spuren von Substanz **152** identifiziert werden
- nach der alternativen Methode (siehe Schema 5.6) konnten 114 mg (78%) von **152** als farbloses Öl erhalten werden

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.38–7.25 (*m*, 5H, 4-H, 5-H, 6-H), 6.80–6.71 (*m*, 3H, 1-H, 2-H), 5.48 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 5.01–4.96 (*m*, 1H, α Ala-CH), 3.55 (*s*, 2H, 3-H), 3.18–3.10 (*m*, 2H, 7-H), 1.48–1.39 (*m*, 3H, Ala-CH₃), 0.92–0.88 (*m*, 1H, 8-H), 0.48–0.43 (*m*, 2H, 9-H), 0.17–0.14 (*m*, 2H, 9-H) ppm.

MS (EI): 430 (100, *M*⁺), 412 (15), 365 (45), 359 (100), 91 (60).

11.10.2.5 Herstellung von (S)-Cyclopropyl-(phenylmethyl)-2-((S)-2-(2-(3,5-difluorphenyl)acetamid)propanamid-2-phenylacetat (**153**)



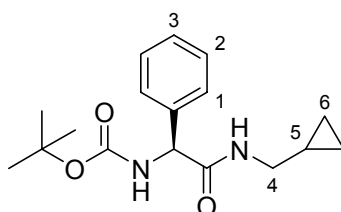
Ausbeute: 259 mg (73%) von **153** als farbloses Öl (1:1 Gemisch der Diastereomere)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.21–7.10 (*m*, 10H, 4-H, 5-H, 6-H, 10-H, 11-H, 12-H), 6.09 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 5.39–5.34 (*m*, 1H, α Ala-CH), 4.19–4.08 (*m*, 2H, 7-H), 3.04–2.90 (*m*, 2H, 3-H), 1.28–1.24 (*m*, 3H, Ala-CH₃), 0.90–0.84 (*m*, 1H, 8-H), 0.42–0.40 (*m*, 2H, 9-H), 0.19–0.14 (*m*, 2H, 9-H) ppm.

MS (EI): 506 (20, *M*⁺), 409 (100), 384 (80), 338 (100).

11.11 Alternative Synthese des am C-Terminus veränderten DAPT-Derivats 152

11.11.1 Herstellung von *tert*-Butyl-(*S*)-(cyclopropylmethylcarbamoyl)-(phenyl)methylcarbammat (**167**)

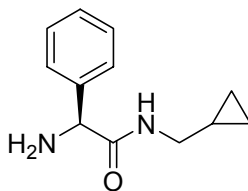


Boc-Phg-OH (**166**, 377 mg, 1.5 mmol) wird in 10 mL DCM gelöst, mit PyBroP (770 mg, 1.65 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min wird das Amin (**165**, 117 mg, 1.65 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 30 mL DCM aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 20 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 20 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende gelbe Öl wird mittels Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, *n*-Hexan/EE 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 388 mg (85%) von **167** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.28–7.15 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 5.58 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 3.18–3.10 (*m*, 2H, 4-H), 1.41 (*s*, 9H, *t*-Bu), 0.92–0.88 (*m*, 1H, 5-H), 0.48–0.43 (*m*, 2H, 6-H), 0.17–0.14 (*m*, 2H, 6-H) ppm.

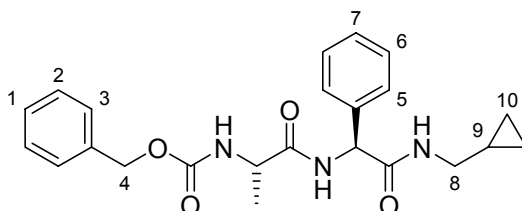
11.11.2 Herstellung von (S)-2-Amino-N-(cyclopropylmethyl)-2-phenylacetamid (**168**)



Eine Lösung von *tert*-Butyl-(S)-(cyclopropylmethyl-carbamoyl)-(phenyl)methylcarbammat (**167**, 388mg, 1.27 mmol) in 10 mL DCM wird mit 1.88 mL (24.5 mmol) TFA versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Die Lösung wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Ausbeute: 260 mg von Amin **168** als gelbes Öl.

11.11.3 Herstellung von Benzyl-(S)-1-((S)-(cyclopropylmethyl-carbamoyl)(phenyl)methylcarbamoyl)ethylcarbammat (**154**)

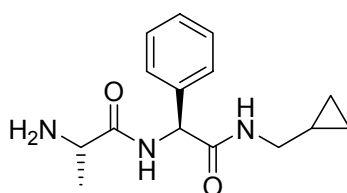


Z-Ala-OH (**156**, 290 mg, 1.3 mmol) wird in 20 mL DCM gelöst, mit EDAC (248 mg, 1.3 mmol) und HOBt-Hydrat (230 mg, 1.5 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min wird das Amin **168** (260 mg, 1.27 mmol) und TEA (277 µl, 2 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 30 mL DCM aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 30 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lsg. (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 146 mg (28%) von Substanz **154** als farbloses Öl

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.33–7.30 (*m*, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 7.25–7.10 (*m*, 5H, 5-H, 6-H, 7-H), 5.54 (*d*, 1H, α Phg-H, *J* = 7.0 Hz), 5.32 (*s*, 2H, 4-H), 4.68–4.64 (*m*, 1H, α Ala-H), 3.18–3.10 (*m*, 2H, 8-H), 0.90–0.86 (*m*, 1H, 9-H), 0.44–0.41 (*m*, 2H, 10-H), 0.15–0.12 (*m*, 2H, 10-H) ppm.

11.11.4 Herstellung von (2*S*)-*N*-((*S*)-(Cyclopropylmethylcarbamoyl)-(phenyl)methyl)-2-aminopropanamid (**169**)

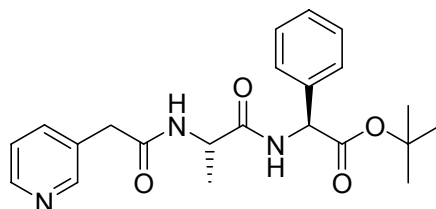


Z-Ala-Phg-amid (**154**, 146 mg, 0.36 mmol) wird in 10 mL EtOH gelöst und mit Palladium auf aktivierter Kohle (Degussa Typ E101, 150 mg) versetzt. Der Kolben wird evakuiert, mit H₂ gefüllt und bei RT gerührt. Nach 150 min wird die Suspension filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 94 mg (95%) von Amin **169** als farbloser Feststoff

11.12 Synthese der γ -Sekretase-Inhibitoren **170** und **171**

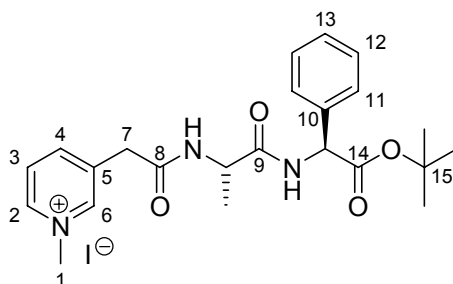
11.12.1 Herstellung von Pyridin-3-essigsäure-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**172**)



Pyridin-3-essigsäure (**174**, 95 mg, 0.55 mmol) wird in 10 mL DCM gelöst, mit EDAC (105 mg, 0.55 mmol) und HOBt-Hydrat (100 mg, 0.65 mmol) versetzt und bei RT gerührt. Nach 10 min werden Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**158**, 139 mg, 0.5 mmol) und TEA (111 μ L, 0.8 mmol) addiert und das Reaktionsgemisch für ca. 20 h bei RT gerührt.

CC(C)(C)OC(=O)[C@H](c1ccccc1)NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)Cc2cc(Br)ncn2

11.12.3 Herstellung von Verbindung 170

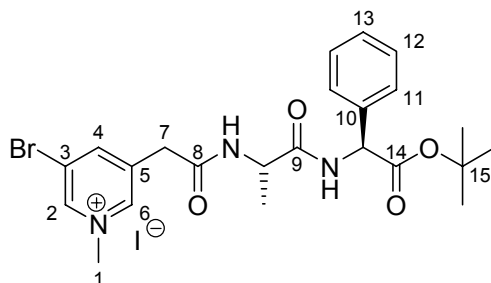


Pyridin-3-essigsäure-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**172**, 160 mg, 0.42 mmol) wird in 2 mL MeOH gelöst, mit Mel (114 μ L, 1.81 mmol) versetzt und bei RT gerührt (20 h). Der Ansatz wird unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 204 mg von **170** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.90 (s, 1H, 6-H), 8.87 (d, 1H, 2-H, J = 5.9 Hz), 8.71 (d, 1H, 4-H, J = 6.8 Hz), 8.56 (d, 1H, NH, J = 7.3 Hz), 8.42 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz), 8.07 (t, 1 arom. H, 3-H, J = 6.8 Hz), 7.37 (s, 5H, 11-H, 12-H, 13-H), 5.21 (d, 1H, α PHg, J = 6.8 Hz), 4.48–4.42 (m, 1H, α -Ala), 4.32 (s, 3H, 1-H), 3.77 (s, 2H, 7-H), 1.34 (s, 9H, *t*-Bu), 1.29 (d, 3H, Ala-CH₃, J = 7.0 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 172.3 (14-COOR), 169.6 (9-CONR), 167.6 (8-CONR), 146.0 (6-C), 145.6 (2-C), 143.8 (4-C), 136.8 (5-C), 136.4 (10-C), 128.8 (11-C), 128.0 (3-C), 127.9 (12-C), 127.2 (13-C), 81.3 (15-C), 57.3 (Phg-CH), 48.1 (Ala-CH), 38.1 (7-C), 27.7 (*t*-Bu), 18.8 (Ala-CH₃) ppm.

11.12.4 Herstellung von Verbindung 171



5-Brom-pyridin-3-essigsäure-Ala-Phg-O(*t*-Bu) (**173**, 367 mg, 0.92 mmol) wird in 5 mL MeOH gelöst, mit Mel (287 μ L, 4.60 mmol) versetzt und bei RT gerührt (20 h). Der Ansatz wird unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Nach Behandlung mit Diethylether kristallisieren 490 mg (90%) von **171** als gelb-brauner Feststoff aus.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.31 (s, 1H, 6-H), 8.96 (s, 1H, 2-H), 8.72–8.69 (m, 2H, 4-H, NH), 8.56 (d, 1H, NH, J = 7.3 Hz), 7.37 (s, 5H, 11-H, 12-H, 13-H), 5.21 (d, 1H, α PHg, J = 6.9 Hz), 4.48–4.41 (m, 1H, α -Ala), 4.30 (s, 3H, 1-H), 3.77 (s, 2H, 7-H), 1.34 (s, 9H, *t*-Bu), 1.29 (d, 3H, Ala-CH₃, J = 7.1 Hz) ppm.

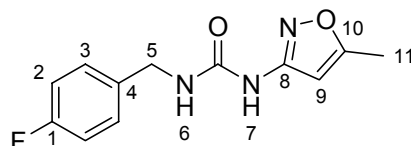
^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 172.5 (14-COOR), 169.8 (9-CONR), 167.5 (8-CONR), 148.5 (4-C), 145.3 (6-C), 145.2 (2-C), 137.8 (5-C), 136.7 (10-C), 129.1 (11-C), 128.7 (13-C), 128.1 (12-C), 121.0 (3-C), 81.6 (15-C), 57.6 (Phg-CH), 48.5 (Ala-CH), 38.0 (7-C), 28.0 (*t*-Bu), 19.0 (Ala-CH₃) ppm.

11.13 Synthese der potentiellen GSK3-Inhibitoren 180-191, 200-203

11.13.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Substanzen 180-191

p-Fluorbenzylisocyanat (**192**, 76 mg, 0.5 mmol) wird in THF (3 mL) gelöst und mit 1.1 Äq. des aromatischen Amins versetzt. Der Ansatz wird unter Rückfluss gerührt (12 h) und anschließend auf RT abgekühlt, wobei das Rohprodukt als Feststoff ausfällt. Nach Umkristallisation aus MeOH, EtOH oder MTBE erhält man die entsprechenden Produkte in hoher Reinheit.

11.13.1.1 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)harnstoff (**180**)



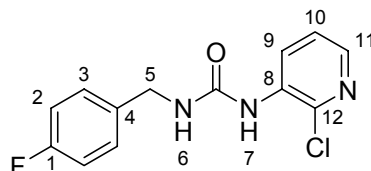
Nach Umkristallisation in MeOH werden 81 mg (71%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)harnstoff **181** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.41 (s, 1H, 7-NH), 7.35–7.30 (*m*, 2H, 3-H), 7.15 (*t*, 2H, 2-H, *J* = 8.8 Hz), 7.00 (*t*, 1H, 6-NH, *J* = 5.7 Hz), 6.39 (s, 1H, 9-H), 4.30 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.8 Hz); 2.32 (s, 3H, 11-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.7 (10-C), 162.7 (1-C), 159.3 (8-C), 153.8 (CONR), 136.0 (4-C), 129.0 (3-C), 115.0 (2-C), 95.4 (9-C), 42.1 (5-C), 11.9 (11-C) ppm.

MS (EI): 249 (28, M^+), 206 (10), 150 (54), 124 (69), 109 (100), 98 (32).

11.13.1.2 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(2-chlorpyridin-3-yl)harnstoff (181)



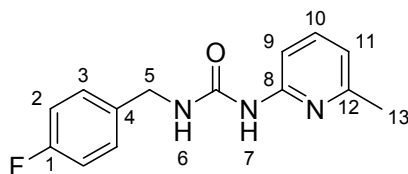
Nach Umkristallisation in MeOH werden 100 mg (72%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(2-chlorpyridin-3-yl)harnstoff **181** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.52 (*dd*, 1H, 11-H, J = 1.6, 8.2 Hz), 8.27 (*s*, 1H, 7-NH), 7.98 (*dd*, 2H, 10-H, J = 1.8, 4.6 Hz), 7.57 (*t*, 1H, 6-NH, J = 5.6 Hz), 7.37–7.32 (*m*, 3H, 3-H, 9-H), 7.20–7.14 (*m*, 2H, 2-H), 4.40 (*d*, 2H, 5-H, J = 5.7 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 154.6 (CONR), 141.5 (8-C), 135.8 (12-C), 133.8 (4-C), 129.2 (3-C), 128.0 (9-C), 123.4 (10-C), 115.1 (2-C), 42.1 (5-C) ppm.

MS (EI): 279 (15, M^+), 244 (17), 151 (6), 130 (31), 128 (100), 124 (10), 109 (94).

11.13.1.3 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)harnstoff (182)



Nach Umkristallisation in MeOH werden 64 mg (49%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)harnstoff **182** als gelber Feststoff erhalten.

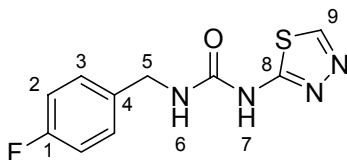
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.45 (*s*, 1H, 7-NH), 8.88 (*s*, 1H, 6-NH), 7.75–7.69 (*m*, 1H, 10-H), 7.55–7.50 (*m*, 2H, 3-H), 7.36–7.29 (*m*, 3H, 2-H, 9-H), 6.94 (*d*, 1H, 11-

H, $J = 7.4$ Hz), 4.55 (*d*, 2H, 5-H, $J = 5.8$ Hz) 2.67 (*td*, 1H, 13-H, $J = 1.8, 3.6$ Hz); 2.5 (*s*, 2H, 13-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 163.0$ (1-C), 159.8 (8-C), 155.2 (CONR), 153.0 (12-C), 138.7 (10-C), 136.4 (4-C), 129.1 (3-C), 116.1 (2-C), 115.3 (11-C), 108.6 (9-C), 42.2 (5-C), 23.9 (CH_3) ppm.

MS (EI): 259 (54, M^+), 151 (4), 135 (16), 124 (18), 108 (100), 92 (7), 81 (21).

11.13.1.4 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-harnstoff (183)

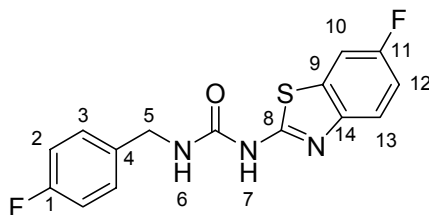


Nach Umkristallisation in MeOH werden 108 mg (86%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-harnstoff **183** als weiß-gelber Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.03$ (*s*, 1H, 7-NH), 8.98 (*s*, 1H, 6-NH), 7.35–7.30 (*m*, 2H, 3-H), 7.17–7.12 (*m*, 3H, 2-H, 9-H), 4.32 (*d*, 2H, 5-H, $J = 5.9$ Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 162.5$ (1-C), 159.7 (CONR), 153.3 (8-C), 147.3 (9-C), 135.3 (4-C), 128.8 (3-C), 114.6 (2-C), 42.1 (5-C) ppm.

MS (EI): 252 (46, M^+), 192 (7), 151 (26), 128 (11), 124 (46), 122 (14), 109 (100), 101 (47 %).

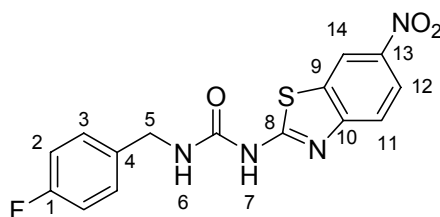
11.13.1.5 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-fluorbenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff (184)

Nach Umkristallisation in MeOH werden 123 mg (77%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-fluorbenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff **184** als weiß-gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.86 (s, 1H, 7-NH), 7.79 (*dd*, 1H, 13-H, *J* = 2.6, 8.7 Hz), 7.64–7.59 (*dd*, 1H, 10-H, *J* = 4.8, 8.8 Hz), 7.39–7.34 (*m*, 2H, 3-H), 7.23–7.14 (*m*, 4H, 2-H, 7-NH, 12-H), 4.36 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.6 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.8 (1-C), 159.6 (11-C), 156.2 (CONR), 135.5 (4-C), 129.2 (3-C), 120.6 (13-C), 115.1 (2-C), 113.5 (12-C), 107.9 (10-C), 42.2 (5-C) ppm.

MS (EI): 319 (7, *M*⁺), 194 (48), 168 (100), 151 (8), 141 (14), 124 (18), 109 (31).

11.13.1.6 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-nitrobenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff (185)

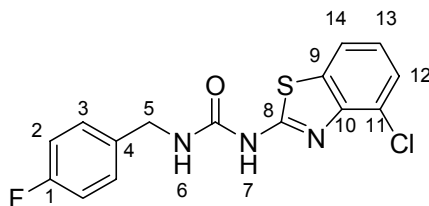
Nach Umkristallisation in EtOH werden 52 mg (30%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(6-nitrobenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff **185** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.35 (s, 1H, 7-NH), 8.93 (s, 1H, 14-H), 8.22 (dd, 1H, 12-H, J = 2.2, 8.9 Hz), 7.74 (d, 1H, 11-H, J = 8.9 Hz), 7.39–7.35 (m, 3H, 3-H, 6-NH), 7.20–7.14 (m, 2H, 2-H), 4.37 (d, 2H, 5-H, J = 5.5 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 164.9 (8-C), 162.6 (1-C), 159.3 (10-C), 153.6 (CONR), 141.9 (13-C), 135.0 (4-C), 131.9 (9-C), 129.0 (3-C), 121.3 (11-C), 119.1 (12-C), 118.2 (14-C), 114.8 (2-C), 42.0 (5-C) ppm.

MS (EI): 346 (17, M^+), 276 (23), 221 (71), 195 (86), 191 (43), 165 (29), 151 (30), 147 (36), 124 (100), 109 (87), 63 (36).

11.13.1.7 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-chlorbenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff (186)



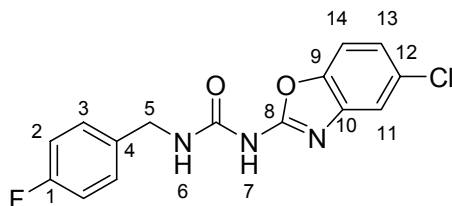
Nach Umkristallisation in EtOH werden 94 mg (56%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-chlorbenz[d]thiazol-2-yl)-harnstoff **186** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.42 (s, 1H, 7-NH), 7.86 (dd, 1H, 14-H, J = 0.7, 7.9 Hz), 7.44 (dd, 1H, 12-H, J = 0.7, 7.8 Hz), 7.39–7.34 (m, 2H, 3-H), 7.22–7.14 (m, 4H, 2-H, 6-NH, 13-H), 4.36 (d, 2H, 5-H, J = 5.8 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 162.8 (8-C), 160.8 (1-C), 153.7 (CONR), 145.9 (10-C), 135.5 (4-C), 133.0 (9-C), 129.2 (3-C), 125.8 (13-C), 123.4 (12-C), 120.4 (14-C), 115.1 (2-C), 42.2 (5-C) ppm.

MS (EI): 335 (11, M^+), 212 (25), 210 (66), 186 (37), 184 (100), 147 (22), 124 (26), 109 (37).

11.13.1.8 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(5-chlorbenz[d]oxazol-2-yl)-harnstoff (187)



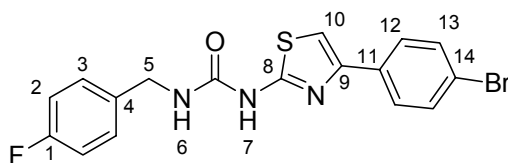
Nach Umkristallisation in EtOH werden 76 mg (45%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(5-chlorbenz[d]oxazol-2-yl)-harnstoff **187** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.33 (s, 1H, 7-NH), 8.67 (t, 1H, 6-NH, *J* = 5.3 Hz), 7.61–7.56 (*m*, 2H, 11-H, 13-H), 7.40–7.36 (*m*, 2H, 3-H), 7.26–7.14 (*m*, 3H, 2-H, 14-H), 4.46 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.4 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.8 (1-C), 158.1 (CONR), 151.9 (8-C), 145.8 (9-C), 141.8 (10-C), 135.4 (4-C), 129.1 (3-C), 128.6 (12-C), 122.7 (13-C), 117.0 (11-C), 115.1 (2-C), 111.0 (14-C), 42.2 (5-C) ppm.

MS (EI): 319 (6, *M*⁺), 276 (7), 194 (28), 168 (100), 124 (25), 109 (43).

11.13.1.9 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-bromphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff (188)



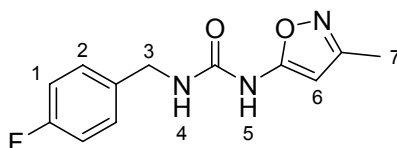
Nach Umkristallisation in MeOH werden 140 mg (70%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-bromphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff **188** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.76 (s, 1H, 7-NH), 7.80 (*d*, 2H, 13-H, *J* = 8.6 Hz), 7.58 (*d*, 2H, 12-H, *J* = 8.5 Hz), 7.52 (s, 1H, 10-H), 7.37–7.32 (*m*, 2H, 3-H), 7.19–7.13 (*m*, 2H, 2-H), 7.03 (t, 1H, 6-NH, *J* = 5.9 Hz), 4.33 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.9 Hz), 4.10 (*q*, 1H, Methanol, *J* = 5.3 Hz), 3.16 (*d*, 3H, Methanol, *J* = 5.2 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.8 (8-C), 159.8 (1-C), 153.9 (CONR), 147.3 (9-C), 135.8 (4-C), 133.6 (13-C), 131.5 (11-C), 129.1 (12-C), 127.5 (3-C), 120.5 (14-C), 115.0 (2-C), 107.5 (10-C), 48.5 (Methanol), 42.1 (5-C) ppm.

MS (EI): 405 (gering, M^+), 280 (3), 256 (100), 254 (97), 212 (23), 133 (13), 89 (17).

11.13.1.10 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(3-methylisoxazol-5-yl)harnstoff (189)

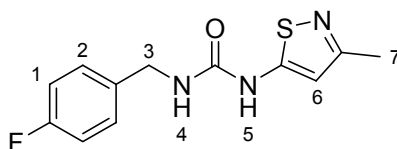


Nach Umkristallisation in MeOH werden 93 mg (75%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(3-methylisoxazol-5-yl)harnstoff **189** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.43 (s, 1H, 5-NH), 7.72–7.68 (m, 2H, 2-H), 7.56–7.50 (m, 2H, 1-H), 7.28 (t, 1H, 4-NH, J = 5.9 Hz), 6.22 (s, 1H, 6-H), 4.66 (d, 2H, 3-H, J = 6.0 Hz); 2.88 (s, 3H, 7-H) ppm.

MS (EI): 249 (7, M^+), 208 (5), 167 (6), 150 (10), 124 (31), 109 (100), 98 (63), 82 (15).

11.13.1.11 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(3-methylisothiazol-5-yl)harnstoff (190)

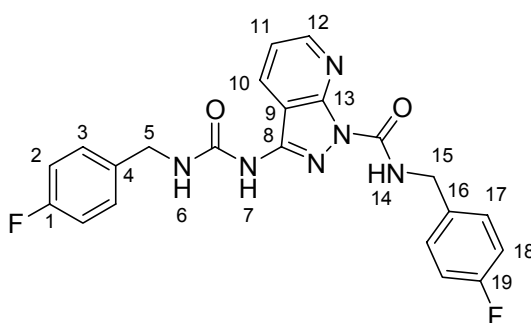


Nach Umkristallisation in MeOH werden 93 mg (70%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(3-methylisothiazol-5-yl)harnstoff **190** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.70 (s, 1H, 5-NH), 7.39 (t, 1H, 4-NH, *J* = 5.9 Hz), 7.35–7.30 (*m*, 2H, 2-H), 7.18–7.12 (*m*, 2H, 1-H), 6.48 (s, 1H, 6-H), 4.30 (*d*, 2H, 3-H, *J* = 5.9 Hz), 2.23 (s, 3H, 7-H) ppm.

MS (EI): 265 (41, *M*⁺), 140 (6), 124 (6), 114 (100), 109 (75), 83 (7).

11.13.1.12 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzylcarbamoyl)-1*H*-pyrazol[3,4-*b*]pyridine-3-yl)-3-(4-fluorbenzyl)harnstoff (191)



Nach Umkristallisation in MeOH werden 106 mg (97%) von 1-(4-Fluorbenzylcarbamoyl)-1*H*-pyrazol[3,4-*b*]pyridine-3-yl)-3-(4-fluorbenzyl)harnstoff **191** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.17 (s, 1H, 7-NH), 9.27 (t, 1H, 6-NH, *J* = 5.6 Hz), 8.69–8.66 (*m*, 2H, 10-H, 12-H), 8.13 (t, 1H, 14-NH, *J* = 5.1 Hz), 7.41–7.35 (*m*, 5H, 3-H, 11-H, 17-H), 7.15 (t, 4H, 2-H, 18-H, *J* = 8.5 Hz), 4.56 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.4 Hz), 4.46 (*d*, 2H, 15-H, *J* = 5.3 Hz) ppm.

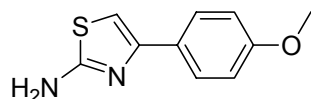
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.8 (1-C), 159.4 (19-C), 154.1 (CONR), 150.3 (CONR), 149.8 (12-C), 149.4 (13-C), 143.3 (8-C), 135.9 (4-C), 135.3 (16-C), 132.8 (10-C), 129.0 (3-C), 128.7 (17-C), 118.5 (11-C), 115.1 (2-C), 114.8 (18-C), 110.3 (9-C), 42.4 (15-C), 42.3 (15-C) ppm.

MS (EI): 436 (gering, *M*⁺), 285 (6), 160 (71), 151 (45), 134 (12), 109 (70).

11.13.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Verbindungen 194–197

Thioharnstoff (**198**, 167 mg, 2.2 mmol) wird in 4 mL MeOH gelöst und mit 2 mmol des entsprechenden Bromacetophenons versetzt. Der Ansatz wird für 20 min unter Rückfluss gerührt, auf RT abgekühlt, in 30 mL EE gelöst/suspendiert und mit ges. Na₂CO₃-Lsg. (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

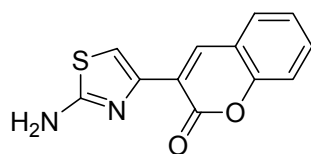
11.13.2.1 Herstellung von 4-(4-Methoxyphenyl)thiazol-2-amin (**194**)



Nach Umkristallisation aus EtOH werden 330 mg (80%) von 4-(4-Methoxyphenyl)thiazol-2-amin **194** als farbloser Feststoff erhalten.

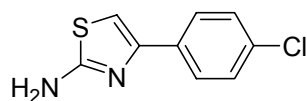
Schmp.: 205-207°C (EtOH)

11.13.2.2 Herstellung von 3-(2-Aminothiazol-4-yl)-2H-chromen-2-on (**195**)



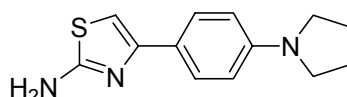
Nach Umkristallisation aus EtOH werden 342 mg (70%) von 3-(2-Aminothiazol-4-yl)-2H-chromen-2-on **195** als gelber Feststoff erhalten.

Schmp.: 225-227°C (EtOH)

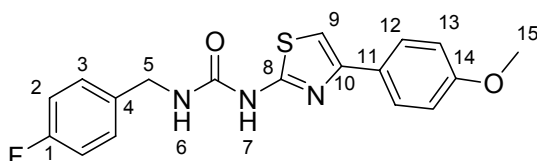
11.13.2.3 Herstellung von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-amin (**196**)

Nach Umkristallisation aus EtOH werden 441 mg (90%) von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-amin **196** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmp.: 172-174°C (EtOH)

11.13.2.4 Herstellung von 4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin (**197**)

Nach Umkristallisation aus EtOH werden 316 mg (75%) von 4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-amin **197** als gelber Feststoff erhalten.

11.13.3.1 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff (**200**)

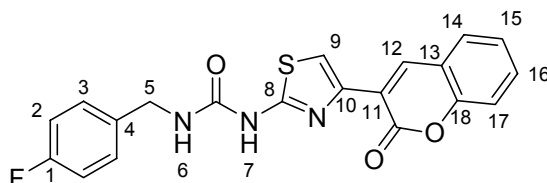
Nach Umkristallisation in MeOH werden 323 mg (82%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff **200** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.71 (s, 1H, 7-NH), 7.78 (d, 2H, 12-H, *J* = 8.6 Hz), 7.35 (dd, 2H, 3-H, *J* = 5.8, 8.2 Hz), 7.26 (s, 1H, 9-H), 7.16 (t, 2H, 2-H, *J* = 8.8 Hz), 7.03 (t, 1H, 6-NH, *J* = 5.2 Hz), 6.96 (d, 2H, 13-H, *J* = 8.7 Hz), 4.34 (d, 2H, 5-H, *J* = 5.7 Hz), 3.77 (s, 3H, 15-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.8 (8-C), 159.6 (1-C), 158.7 (14-C), 153.9 (CONR), 148.4 (10-C), 135.8 (4-C), 129.2 (3-C), 127.2 (11-C), 126.8 (12-C), 115.0 (2-C), 113.9 (13-C), 104.5 (9-C), 55.0 (5-C), 42.1 (15-C) ppm.

MS (EI): 357 (gering, M^+), 207 (11), 206 (100), 191 (22), 164 (9), 149 (28), 109 (10).

11.13.3.2 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-harnstoff (**201**)



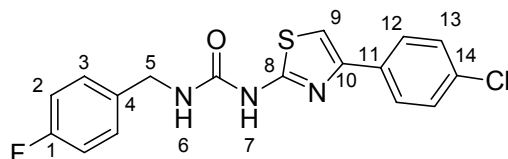
Nach Umkristallisation in MeOH werden 292 mg (66%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-harnstoff **201** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.76 (s, 1H, 7-NH), 8.52 (s, 1H, 12-H), 7.85 (s, 1H, 9-H), 7.81 (dd, 1H, 14-H, J = 1.4, 7.8 Hz), 7.60 (ddd, 1H, 16-H, J = 1.6, 7.3, 8.7 Hz), 7.43–7.33 (m, 4H, 3-H, 15-H, 17-H), 7.19–7.13 (m, 2H, 2-H), 7.08 (t, 1H, 6-NH, J = 5.8 Hz), 4.35 (d, 2H, 5-H, J = 5.8 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.6 (8-C), 159.1 (1-C), 158.4 (COOR), 153.6 (CONR), 152.0 (18-C), 141.5 (10-C), 137.8 (12-C), 135.4 (4-C), 131.3 (11-C), 129.0 (3-C), 128.4 (16-C), 124.3 (14-C), 120.0 (13-C), 118.8 (15-C), 115.5 (17-C), 114.8 (2-C), 112.8 (9-C), 41.9 (5-C) ppm.

MS (EI): 395 (4, M^+), 270 (100), 244 (43), 242 (24), 174 (15), 145 (7), 124 (18), 109 (9).

11.13.3.3 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff (**202**)



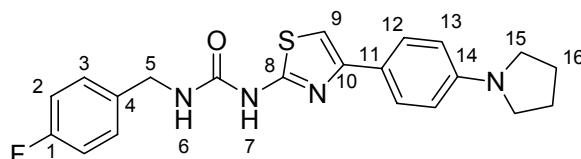
Nach Umkristallisation in MeOH werden 331 mg (78%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-yl)-harnstoff **202** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.76 (s, 1H, 7-NH), 7.88–7.83 (*m*, 2H, 12-H), 7.50 (s, 1H, 9-C), 7.46–7.43 (*m*, 2H, 13-H), 7.37–7.32 (*m*, 2H, 3-H), 7.18–7.12 (*m*, 2H, 2-H), 7.03 (*t*, 1H, 6-NH, *J* = 5.9 Hz), 4.33 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.9 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.8 (8-C), 159.9 (1-C), 153.9 (CONR), 147.2 (10-C), 135.7 (4-C), 133.2 (14-C), 131.9 (11-C), 129.0 (3-C), 128.6 (13-C), 127.2 (12-C), 115.0 (2-C), 107.4 (9-C), 42.1 (5-C) ppm.

MS (EI): 361 (gering, *M*⁺), 212 (38), 210 (100), 168 (41), 133 (10), 124 (11), 109 (12).

11.13.3.4 Herstellung von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)thiazol-2-yl)harnstoff (**203**)



Nach Umkristallisation in MTBE werden 370 mg (93%) von 1-(4-Fluorbenzyl)-3-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)thiazol-2-yl)harnstoff **203** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.63 (s, 1H, 7-NH), 7.64 (*d*, 2H, 12-H, *J* = 8.5 Hz), 7.35 (*dd*, 2H, 3-H, *J* = 5.8, 8.2 Hz), 7.15 (*t*, 2H, 2-H, *J* = 8.8 Hz), 7.03 (s, 1H, 9-H), 6.52 (*d*, 2H, 13-H, *J* = 8.6 Hz), 4.34 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 5.6 Hz), 3.20 (s, 4H, 15-H), 1.92 (s, 4H, 16-H) ppm.

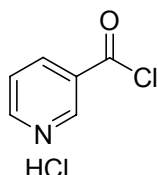
^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.9 (8-C), 159.5 (1-C), 154.0 (CONR), 149.4 (14-C), 147.2 (10-C), 135.9 (4-C), 129.1 (3-C), 126.6 (12-C), 122.0 (11-C), 115.2 (2-C), 111.5 (13-C), 101.2 (9-C), 47.2 (15-C), 42.2 (5-C), 24.9 (16-C) ppm.

11.14 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 294-324

11.14.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Carbonsäurechloride 273–279

Carbonsäure (**266–272**, 20 mmol), Thionylchlorid (2.90 mL, 40 mmol) und 2 Tropfen DMF werden in Toluol (20 mL) gemischt und unter Rückfluss erhitzt (3-6 h). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und im HV getrocknet. Die entsprechenden Carbonsäurechloride **273–279** werden ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

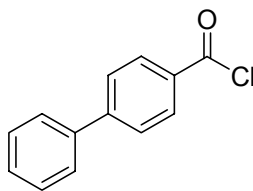
11.14.1.1 Herstellung von Nicotinoylchlorid-Hydrochlorid (273)



Ausbeute: 3.24 g (91%) von Nicotinoylchlorid-Hydrochlorid **273** als farbloser Feststoff

Schmp.: 152-153°C

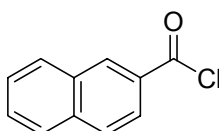
11.14.1.2 Herstellung von Biphenylcarbonsäurechlorid (274)



Ausbeute: 4.16 g (96%) von Biphenylcarbonsäurechlorid **274** als farbloser Feststoff

Schmp.: 115-116°C

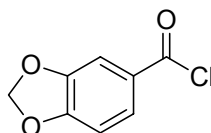
11.14.1.3 Herstellung von 2-Naphthoylchlorid (275)



Ausbeute: 3.66 g (96%) von 2-Naphthoylchlorid **275** als farbloser Feststoff

Schmp.: 51°C

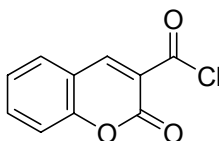
11.14.1.4 Herstellung von Benz[d][1,3]dioxol-5-carbonsäurechlorid (276)



Ausbeute: 3.21 g (87%) von Benz[d][1,3]dioxol-5-carbonsäurechlorid **276** als farbloser Feststoff

Schmp.: 80°C

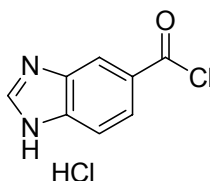
11.14.1.5 Herstellung von 2-Oxo-2*H*-chromen-3-carbonsäurechlorid (277)



Ausbeute: 3.42 g (82%) von 2-Oxo-2*H*-chromen-3-carbonsäurechlorid **277** als gelber Feststoff

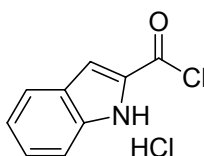
Schmp.: 145-147°C

11.14.1.6 Herstellung von 1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid (278)



Ausbeute: 3.65 g (84%) von 1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid **278** als brauner Feststoff

11.14.1.7 Herstellung von 1*H*-Indol-2-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid (279)



Ausbeute: 3.76 g (87%) von 1*H*-Indol-2-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid **279** als brauner Feststoff

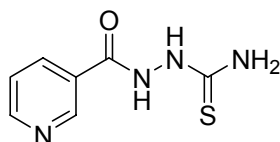
11.14.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide 281–284

Thiosemicarbazid (**260**, 365 mg, 4 mmol) wird in ca. 4 mL trockenem Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Carbonsäurechlorid (**274–277**, 4.4 mmol) versetzt und bei RT gerührt (12 h). Überschüssiges Pyridin wird im Vakuum entfernt, so dass eine Mischung aus Rohprodukt und Pyridin-Hydrochlorid zurückbleibt. Das Gemisch wird mit Wasser gewaschen und der resultierende Feststoff in EtOH umkristallisiert.

11.14.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide 280, 285, 286

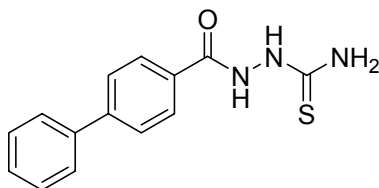
Thiosemicarbazid (**260**, 365 mg, 4 mmol) wird in ca. 4 mL trockenem Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Carbonsäurechlorid (**273**, **278**, **279**, 4.4 mmol) versetzt und bei RT gerührt (12 h). Überschüssiges Pyridin wird im Vakuum entfernt, so dass eine Mischung aus Rohprodukt und Pyridin-Hydrochlorid zurückbleibt. Das Gemisch in EtOH/Wasser umkristallisiert.

11.14.4 Herstellung von Thiosemicarbazid 280



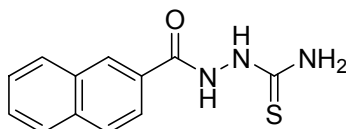
Ausbeute: 432 mg (55%) von Thiosemicarbazid **280** als farbloser Feststoff

11.14.5 Herstellung von Thiosemicarbazid **281**



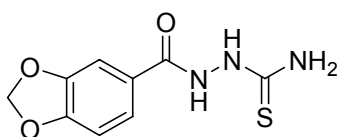
Ausbeute: 640 mg (59%) von Thiosemicarbazid **281** als farbloser Feststoff

11.14.6 Herstellung von Thiosemicarbazid **282**



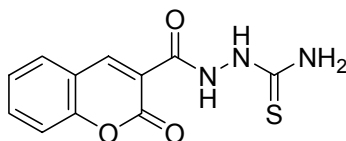
Ausbeute: 706 mg (72%) von Thiosemicarbazid **282** als farbloser Feststoff

11.14.7 Herstellung von Thiosemicarbazid **283**



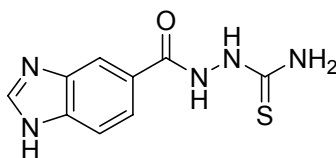
Ausbeute: 450 mg (47%) von Thiosemicarbazid **283** als farbloser Feststoff

11.14.8 Herstellung von Thiosemicarbazid **284**



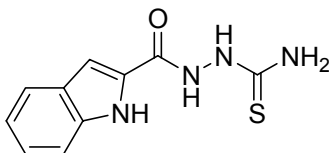
Ausbeute: 621 mg (59%) von Thiosemicarbazid **284** als gelber Feststoff

11.14.9 Herstellung von Thiosemicarbazid **285**



Ausbeute: 621 mg (59%) von Thiosemicarbazid **285** als brauner Feststoff

11.14.10 Herstellung von Thiosemicarbazid **286**

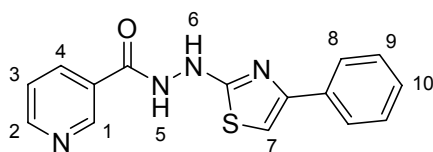


Ausbeute: 384 mg (41%) von Thiosemicarbazid **286** als brauner Feststoff

11.14.11 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide 294-324

Thiosemicarbazid (**280-286**, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**287-293**, 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE (wahlweise auch DCM) gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Der Feststoff lässt sich nur selten vollständig in Lösung bringen, was teilweise zu niedrigen Ausbeuten führt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

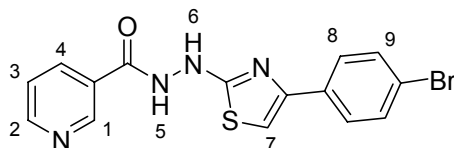
11.14.11.1 Herstellung von *N'*-(4-Phenylthiazol-2-yl)nicotinhydrazid (**294**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 60 mg (40%) von *N'*-(4-Phenylthiazol-2-yl)nicotinhydrazid **294** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.10 (s, 1H, 5-NH), 9.78 (s, 1H, 6-NH), 9.10 (s, 1H, 1-CH), 8.80 (d, 1H, 2-H, *J* = 3.7 Hz), 8.27 (d, 1H, 4-H, *J* = 8.0 Hz), 7.84 (d, 2H, 8-H, *J* = 7.4 Hz), 7.60 (dd, 1H, 3-H, *J* = 4.9, 7.8 Hz), 7.40 (t, 2H, 9-H, *J* = 7.5 Hz), 7.32–7.27 (m, 2H, 10-H, Thiazol) ppm.

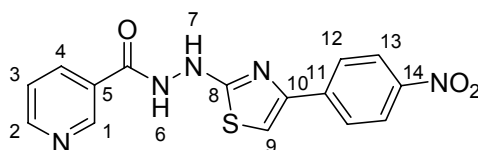
11.14.11.2 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid (**295**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 98 mg (52%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid **295** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.11 (s, 1H, 5-NH), 9.81 (s, 1H, 6-NH), 9.10 (s, 1H, 1-H), 8.80 (d, 1H, 2-H, *J* = 4.4 Hz), 8.26 (d, 1H, 4-H, *J* = 8.1 Hz), 7.80 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.6 Hz), 7.61–7.58 (m, 3H, 3-H, 8-H), 7.37 (s, 1H, 7-H) ppm.

11.14.11.3 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid (**296**)

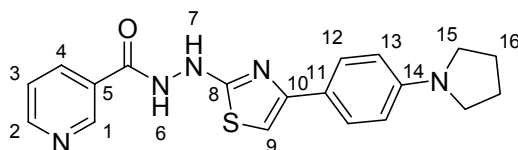


Nach Umkristallisation aus EE werden 63 mg (37%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid **296** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.16 (s, 1H, 6-NH), 9.94 (s, 1H, 7-NH), 9.08 (s, 1H, 1-H), 8.80 (d, 1H, 2-H, *J* = 4.1 Hz), 8.27–8.24 (m, 3H, 4-H, 13-H), 8.09 (d, 2H, 12-H, *J* = 8.8 Hz), 7.67 (s, 1H, 9-H), 7.59 (dd, 1H, 3-H, *J* = 4.9, 7.8 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.5 (8-C), 165.1 (CONR), 152.7 (1-C), 148.5 (14-C), 148.3 (2-C), 146.2 (10-C), 140.5 (11-C), 135.2 (4-C), 127.9 (5-C), 126.4 (12-C), 124.1 (13-C), 123.8 (3-C), 108.1 (9-C) ppm.

11.14.11.4 Herstellung von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid (297)

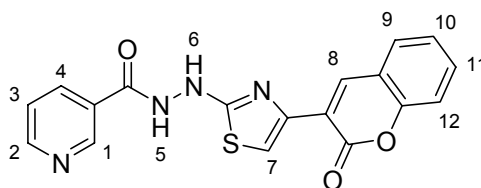


Nach Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 100:10:1) werden 87 mg (49%) von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid **297** als violetter Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.04 (s, 1H, 6-NH), 9.63 (s, 1H, 7-NH), 9.07 (s, 1H, 1-H), 8.79 (s, 1H, 2-H), 8.25 (d, 1H, 4-H, J = 7.8 Hz), 7.63 (d, 2H, 12-H, J = 8.6 Hz), 7.60–7.56 (m, 1H, 3-H), 6.88 (s, 1H, 9-H), 6.52 (d, 2H, 13-H, J = 8.7 Hz), 3.23 (s, 4H, 15-H), 1.93 (s, 4H, 16-H) ppm.

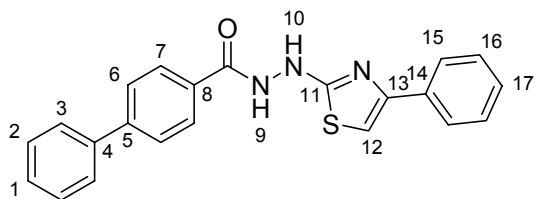
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.7 (8-C), 165.1 (CONR), 152.7 (1-C), 151.5 (14-C), 148.3 (2-C), 147.1 (10-C), 135.2 (4-C), 128.2 (5-C), 126.6 (12-C), 123.8 (3-C), 122.2 (11-C), 111.4 (13-C), 98.5 (9-C), 47.2 (15-C), 24.9 (16-C) ppm.

11.14.11.5 Herstellung von *N'*-(4-(2-Oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid (298)



Nach Umkristallisation aus EE werden 55 mg (30%) von *N'*-(4-(2-Oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid **298** als farbloser Feststoff erhalten.

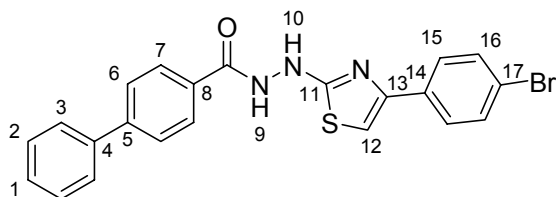
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.16 (s, 1H, 5-NH), 9.85 (s, 1H, 6-NH), 9.08 (s, 1H, 1-H), 8.80 (d, 1H, 2-H, J = 3.6 Hz), 8.57 (s, 1H, 8-H), 8.27 (d, 1H, 4-H, J = 7.9 Hz), 7.88 (d, 1H, 3-H, J = 7.2 Hz), 7.73 (s, 1H, 7-H), 7.65–7.59 (m, 2H, 9-H, 11-H), 7.46–7.39 (m, 2H, 10-H, 12-H) ppm.

11.14.11.6 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid (**299**)

Nach Umkristallisation aus EE werden 98 mg (53%) von Biphenyl-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid **299** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.93 (s, 1H, 9-NH), 9.69 (s, 1H, 10-NH), 8.01 (*d*, 2H, 7-H, *J* = 8.3 Hz), 7.84 (*d*, 4H, arom. H, *J* = 7.7 Hz), 7.75 (*d*, 2H, arom. H, *J* = 7.3 Hz), 7.50 (*t*, 2H, 2-H, *J* = 7.4 Hz), 7.44–7.36 (*m*, 3H, 12-H, 16-H), 7.28–7.26 (*m*, 2H, 1-H, 17-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.6 (11-C), 166.1 (CONR), 150.5 (13-C), 143.6 (5-C), 138.9 (4-C), 134.5 (8-C), 131.0 (14-C), 129.0, 128.5, 128.1, 127.5, 126.9, 125.5 (arom. C), 103.1 (12-C) ppm.

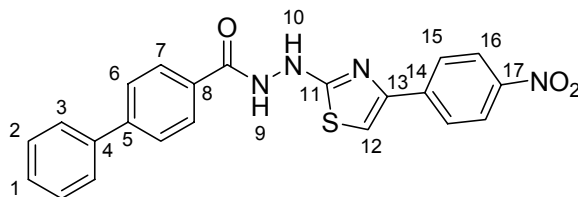
11.14.11.7 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-(4-bromphenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (**300**)

Nach Umkristallisation aus EE werden 181 mg (80%) von Biphenyl-*N'*-(4-(4-bromphenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **300** als gelb-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.97 (s, 1H, 9-NH), 9.75 (s, 1H, 10-NH), 8.02 (*d*, 2H, 7-H, *J* = 8.3 Hz), 7.86–7.74 (*m*, 6H, arom. H), 7.59 (*d*, 2H, 6-H, *J* = 8.5 Hz), 7.54–7.43 (*m*, 3H, arom. H), 7.35 (s, 1H, 12-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 172.7 (11-C), 166.1 (CONR), 149.4 (13-C), 143.6 (5-C), 138.9 (4-C), 133.8 (8-C), 131.5 (16-C), 131.0 (14-C), 129.0, 128.1, 127.5, 126.9, 126.8 (arom. C), 120.4 (17-C), 104.0 (12-C) ppm.

11.14.11.8 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (**301**)

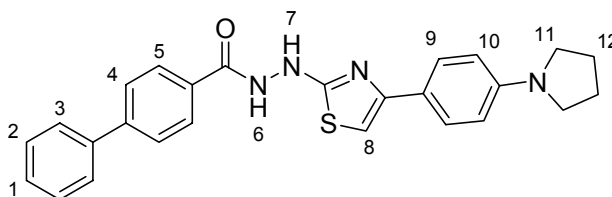


Nach Umkristallisation aus EE werden 92 mg (44%) von Biphenyl-*N'*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **301** als gelber Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11.02 (s, 1H, 9-NH), 9.89 (s, 1H, 10-NH), 8.27 (d, 2H, 16-H, J = 8.8 Hz), 8.10 (d, 2H, 15-H, J = 8.8 Hz), 8.03 (d, 2H, 7-H, J = 8.2 Hz), 7.85 (d, 2H, 6-H, J = 8.2 Hz), 7.76 (d, 2H, 3-H, J = 7.3 Hz), 7.67 (s, 1H, 12-H), 7.54–7.49 (m, 2H, 2-H), 7.45–7.40 (m, 1H, 1-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 172.8 (11-C), 165.8 (CONR), 148.3 (13-C), 145.9 (17-C), 143.4 (14-C), 140.3 (5-C), 138.6 (4-C), 130.6 (8-C), 128.7, 127.9, 127.8, 126.6, 126.5, 126.1 (arom. C), 123.8 (16-C), 107.7 (12-C) ppm.

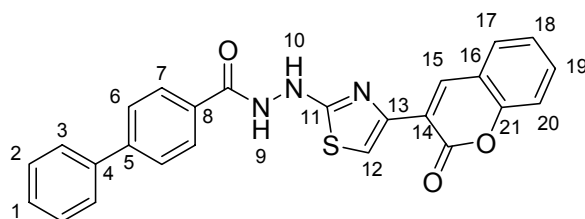
11.14.11.9 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (**302**)



Nach Umkristallisation aus EE/MeOH werden 53 mg (24%) von Biphenyl-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **302** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.90 (s, 1H, 6-NH), 9.57 (s, 1H, 7-NH), 8.06–8.00 (m, 2H, 5-H), 7.84 (d, 2H, 4-H, *J* = 8.3 Hz), 7.76 (d, 2H, 3-H, *J* = 7.2 Hz), 7.65 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.6 Hz), 7.51 (t, 2H, 2-H, *J* = 7.3 Hz), 7.45–7.40 (m, 1H, 1-H), 6.88 (s, 1H, 8-H), 6.54 (d, 1H, 10-H, *J* = 8.7 Hz), 3.24 (s, 4H, 11-H), 1.95 (s, 4H, 12-H) ppm.

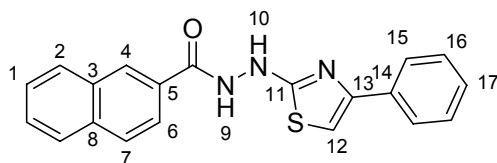
11.14.11.10 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-(2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-benzhydrazid (**303**)



Nach Umkristallisation aus EE/MeOH werden 85 mg (39%) von Biphenyl-*N'*-(4-(2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-benzhydrazid **303** als gelb-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.03 (s, 1H, 9-NH), 9.80 (s, 1H, 10-NH), 8.58 (s, 1H, 15-H), 8.03 (d, 2H, 7-H, *J* = 8.1 Hz), 7.89–7.84 (m, 3H, arom. H), 7.77–7.73 (m, 3H, arom. H), 7.65–7.60 (m, 1H, arom. H), 7.53–7.49 (m, 2H, arom. H), 7.46–7.43 (m, 2H, arom. H), 7.40–7.35 (m, 1H, 22-H) ppm.

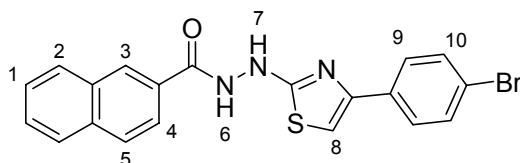
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.0 (11-C), 165.9 (CONR), 158.4 (COOR), 151.9 (13-C), 143.8 (21-C), 143.3 (5-C), 138.6 (4-C), 138.1 (15-C), 131.3, 130.7, 128.7, 128.5, 127.8, 126.6, 124.4, 120.1 (arom. C), 118.9 (16-C), 115.5 (20-C), 109.7 (12-C) ppm.

11.14.11.11 Herstellung von *N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid (**304**)

Nach Umkristallisation aus EE werden 67 mg (39%) von *N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid **304** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.05 (s, 1H, 9-NH), 9.76 (s, 1H, 10-NH), 8.56 (s, 1H, 4-H), 8.08–7.97 (*m*, 4H, 2-H, 6-H, 7-H), 7.85 (*d*, 2H, 15-H, *J* = 7.0 Hz), 7.68–7.58 (*m*, 2H, 1-H), 7.42–7.37 (*m*, 2H, 16-H), 7.31–7.28 (*m*, 2H, 12-H, 17-H) ppm.

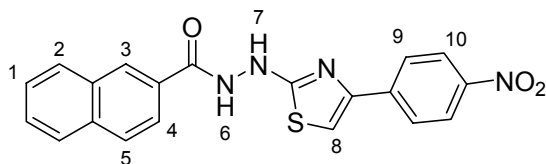
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.3 (11-C), 166.3 (CONR), 150.3 (13-C), 134.3 (3-C), 134.1 (14-C), 131.7 (8-C), 129.3 (5-C), 128.7, 128.2, 128.0, 127.7, 127.4, 127.2, 126.7, 125.2 (arom. C), 123.6 (6-C), 102.8 (12-CH) ppm.

11.14.11.12 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid (**305**)

Nach Umkristallisation aus EE werden 63 mg (30%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid **305** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.05 (s, 1H, 6-NH), 9.78 (s, 1H, 7-NH), 8.55 (s, 1H, 3-H), 8.10–7.96 (*m*, 4H, 2-H, 4-H, 5-H), 7.80 (*d*, 2H, 10-CH, *J* = 8.5 Hz), 7.67–7.63 (*m*, 2H, 1-H), 7.59 (*d*, 2H, 9-H, *J* = 8.5 Hz), 7.36 (s, 1H, 8-H) ppm.

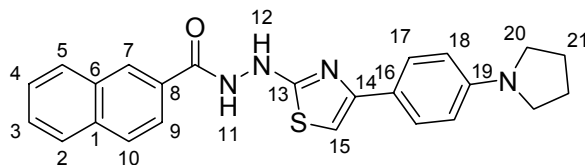
11.14.11.13 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid (**306**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 65 mg (33%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid **306** als gelb-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.08 (s, 1H, 6-NH), 9.89 (s, 1H, 7-NH), 8.56 (s, 1H, 3-H), 8.27 (*d*, 2H, 10-H, *J* = 8.8 Hz), 8.11 (*d*, 2H, 9-H, *J* = 8.9 Hz), 8.07 (*d*, 2H, 2-H, *J* = 8.6 Hz), 8.02 (*d*, 1H, 4-H, *J* = 7.9 Hz), 7.98 (*d*, 1H, 5-H, *J* = 8.3 Hz), 7.68–7.64 (*m*, 3H, 1-H, 8-H) ppm.

11.14.11.14 Herstellung von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid (**307**)

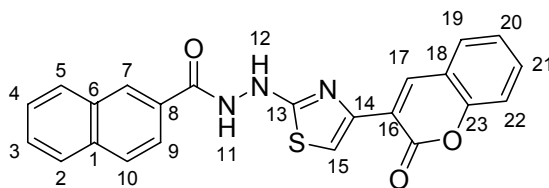


Nach Umkristallisation aus EE werden 98 mg (47%) von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid **307** als gelb-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.01 (s, 1H, 11-NH), 9.64 (s, 1H, 12-NH), 8.56 (s, 1H, 7-H), 8.09–7.97 (*m*, 4H, 2-H, 5-H, 9-H, 10-H), 7.67–7.64 (*m*, 4H, 3-H, 4-H, 17-H), 6.88 (s, 1H, 15-H), 6.53 (*d*, 2H, 18-H, *J* = 8.5 Hz), 3.23 (s, 4H, 20-H), 1.93 (s, 4H, 21-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.0 (13-C), 166.3 (CONR), 151.2 (14-C), 146.7 (19-C), 134.1 (6-C), 131.7 (8-C), 129.4 (1-C), 128.7 (5-C), 127.9 (7-C), 127.7 (3-C, 10-C), 127.4 (2-C), 126.6 (4-C), 126.3 (17-C), 123.6 (9-C), 122.0 (16-C), 111.1 (18-C), 98.0 (15-C), 48.9 (20-C), 24.6 (21-C) ppm.

11.14.11.15 Herstellung von *N'*-(4-(2-Oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid (**308**)

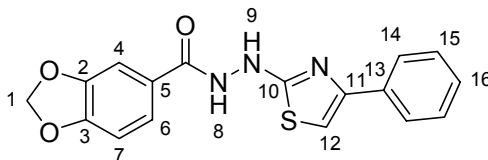


Nach Umkristallisation aus EE werden 105 mg (51%) von *N'*-(4-(2-Oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-2-naphthohydrazid **308** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.12 (s, 1H, 11-NH), 9.84 (s, 1H, 10-NH), 8.59 (s, 1H, 17-H), 8.57 (s, 1H, 7-H), 8.10–8.00 (*m*, 4H, 2-H, 9-H, 10-H), 7.87 (*d*, 1H, 19-H, *J* = 7.1 Hz), 7.74 (s, 1H, 15-H), 7.66–7.60 (*m*, 3H, 3-H, 4-H, 21-H), 7.44 (*d*, 1H, 22-H, *J* = 8.2 Hz), 7.38 (*t*, 1H, 20-H, *J* = 7.3 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.9 (13-C), 167.4 (CONR), 159.4 (COOR), 153.0 (14-C), 144.8 (23-C), 139.1 (17-C), 135.2 (6-C), 132.7 (8-C), 132.3 (5-C), 130.3 (1-C), 129.7 (7-C), 129.5 (3-C), 129.0 (10-C), 128.8 (2-C), 128.4 (4-C), 127.7 (19-C), 125.4 (20-C), 124.5 (9-C), 121.1 (16-C), 119.9 (18-C), 116.5 (22-C), 110.7 (15-C) ppm.

11.14.11.16 Herstellung von *N'*-(4-Phenylthiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxol-5-carbhydrazid (**309**)



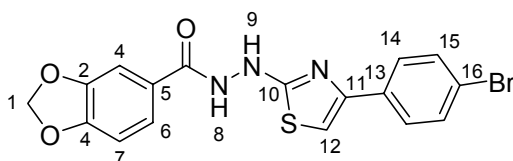
Nach Umkristallisation aus EE werden 111 mg (58%) von *N'*-(4-Phenylthiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxol-5-carbhydrazid **309** als violetter Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.74 (s, 1H, 8-NH), 9.62 (s, 1H, 9-NH), 7.84 (*d*, 2H, 14-H, *J* = 7.3 Hz), 7.53 (*dd*, 1H, 6-H, *J* = 1.4, 8.1 Hz), 7.44–7.36 (*m*, 3H, 4-H, 16-

H), 7.29 (*d*, 1H, 15-H, *J* = 7.3 Hz), 7.24 (*s*, 1H, 12-H), 7.06 (*d*, 1H, 7-H, *J* = 8.1 Hz), 6.13 (*s*, 2H, 1-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.5 (10-C), 165.3 (CONR), 150.3 (2-C), 150.1 (3-C), 147.2 (10-C), 134.3 (13-C), 128.2 (15-C), 127.2 (16-C), 125.8 (5-C), 125.2 (14-C), 122.4 (6-C), 107.9 (7-C), 107.0 (4-C), 102.7 (12-C), 101.5 (1-C) ppm.

11.14.11.17 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxol-5-carbhydrazid (**310**)

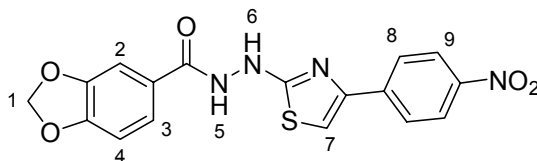


Nach Umkristallisation aus EE werden 166 mg (80%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxol-5-carbhydrazid **310** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.74 (*s*, 1H, 8-NH), 9.66 (*s*, 1H, 9-NH), 7.79 (*d*, 2H, 14-H, *J* = 8.5 Hz), 7.58 (*d*, 2H, 15-H, *J* = 8.5 Hz), 7.52 (*dd*, 1H, 6-H, *J* = 1.0, 8.2 Hz), 7.43 (*s*, 1H, 4-H), 7.32 (*s*, 1H, 12-H), 7.05 (*d*, 1H, 7-H, *J* = 8.1 Hz), 6.13 (*s*, 2H, 1-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.6 (10-C), 165.2 (CONR), 150.1 (3-C), 149.1 (2-C), 147.2 (11-C), 133.5 (13-C), 131.1 (15-C), 127.2 (14-C), 125.7 (5-C), 122.4 (6-C), 120.1 (16-C), 107.8 (7-C), 106.9 (4-C), 103.6 (12-C), 101.5 (1-C) ppm.

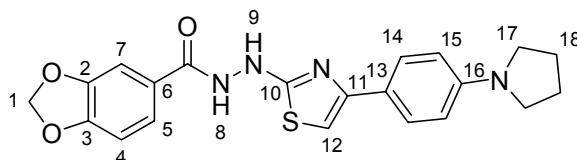
11.14.11.18 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)benz[d][1,3]dioxo-5-carbhydrazid (**311**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 45 mg (23%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)benz[d][1,3]dioxo-5-carbhydrazid **311** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.78 (s, 1H, 5-NH), 9.78 (s, 1H, 6-NH), 8.26 (*d*, 2H, 9-H, *J* = 8.9 Hz), 8.08 (*d*, 2H, 8-H, *J* = 8.9 Hz), 7.64 (s, 1H, 7-H), 7.52 (*dd*, 1H, 3-H, *J* = 1.3, 8.2 Hz), 7.42 (*d*, 1H, 2-H, *J* = 1.1 Hz), 7.06 (*d*, 1H, 4-H, *J* = 8.1 Hz), 6.13 (s, 2H, 1-H) ppm.

11.14.11.19 Herstellung von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benz[d][1,3]dioxo-5-carbhydrazid (**312**)



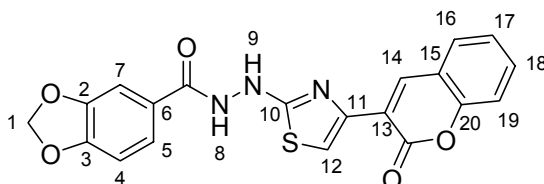
Ausbeute: 168 mg (82%) von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benz[d][1,3]dioxo-5-carbhydrazid **312** als brauner Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.70 (s, 1H, 8-NH), 9.50 (s, 1H, 9-NH), 7.62 (*d*, 2H, 14-H, *J* = 8.4 Hz), 7.52 (*dd*, 1H, 5-H, *J* = 1.1, 8.1 Hz), 7.43 (s, 1H, 7-H), 7.05 (*d*, 1H, 4-H, *J* = 8.1 Hz), 6.85 (s, 1H, 12-H), 6.52 (*d*, 1H, 15-H, *J* = 8.4 Hz), 6.13 (s, 2H, 1-H), 3.23 (s, 4H, 17-H), 1.94 (s, 4H, 18-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.7 (10-C), 165.8 (CONR), 151.7 (3-C), 150.6 (16-C), 147.7 (2-C), 147.3 (11-C), 126.8 (14-C), 126.4 (6-C), 122.9 (5-C), 122.5 (13-

C), 111.6 (15-C), 108.4 (4-C), 107.5 (7-C), 102.1 (1-C), 98.5 (12-C), 47.5 (17-C), 25.2 (18-C) ppm.

11.14.11.20 Herstellung von *N'*-(4-(2-Oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxo-5-carbhydrazid (**313**)

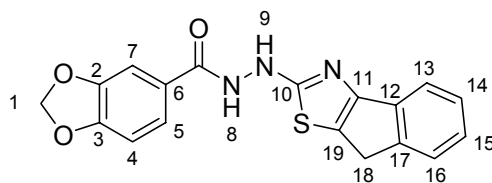


Nach Umkristallisation aus EE werden 66 mg (32%) von *N'*-(4-(2-Oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxo-5-carbhydrazid **313** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.80 (s, 1H, 8-NH), 9.70 (s, 1H, 9-NH), 8.56 (s, 1H, 14-H), 7.87 (*d*, 1H, 16-H, *J* = 7.2 Hz), 7.70 (s, 1H, 12-H), 7.62–7.52 (*m*, 2H, 5-H, 18-H), 7.43–7.38 (*m*, 3H, 7-H, 17-H, 19-H), 7.06 (*d*, 1H, 4-H, *J* = 7.9 Hz), 6.13 (s, 2H, 1-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.8 (10-C), 165.1 (CONR), 158.1 (COOR), 151.7 (11-C), 149.9 (3-C), 146.9 (2-C), 143.5 (20-C), 137.8 (14-C), 131.0 (18-C), 128.7 (16-C), 125.4 (13-C), 124.1 (17-C), 122.1 (19-C), 119.8 (6-C), 118.6 (15-C), 115.2 (5-C), 109.4 (12-C), 107.6 (4-C), 106.7 (7-C), 101.3 (1-C) ppm.

11.14.11.21 Herstellung von *N'*-(8*H*-Inden[1,2-*d*]thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxo-5-carbhydrazid (**314**)

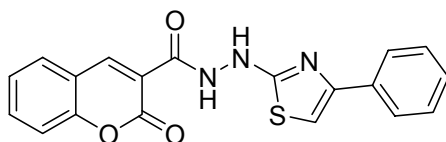


Nach Umkristallisation aus EE werden 140 mg (53%) von *N'*-(8*H*-Inden[1,2-*d*]thiazol-2-yl)benz[*d*][1,3]dioxo-5-carbhydrazid **314** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.77 (s, 1H, 8-NH), 9.68 (s, 1H, 9-NH), 7.55–7.44 (m, 4H, 5-H, 7-H, 14-H, 16-H), 7.31 (t, 1H, 14-H, *J* = 7.4 Hz), 7.17 (t, 1H, 15-H, *J* = 7.4 Hz), 7.06 (d, 1H, 4-H, *J* = 8.1 Hz), 6.14 (s, 2H, 1-H), 3.73 (s, 2H, 18-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 177.1 (10-C), 165.6 (CONR), 156.6 (3-C), 150.4 (2-C), 147.5 (11-C), 145.4 (12-C), 137.5 (17-C), 126.4 (16-C), 126.0 (6-C), 124.8 (15-C), 124.5 (19-C), 124.3 (13-C), 122.7 (14-C), 117.6 (5-C), 108.2 (4-C), 107.3 (7-C), 101.9 (1-C), 32.2 (18-C) ppm.

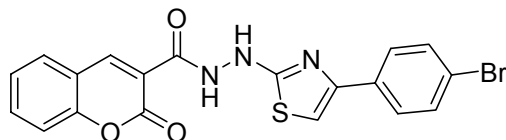
11.14.11.22 Herstellung von 2-Oxo-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)2*H*-chromen-3-carbhydrazid (**315**)



Ausbeute: 107 mg (59%) von 2-Oxo-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)2*H*-chromen-3-carbhydrazid **315** als gelber Feststoff

Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

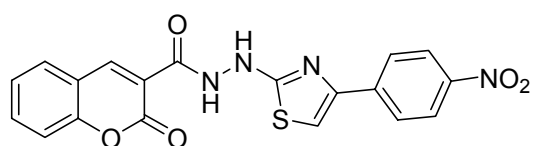
11.14.11.23 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)2-oxo-2*H*-chromen-3-carbhydrazid (**316**)



Ausbeute: 105 mg (47%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)2-oxo-2*H*-chromen-3-carbhydrazid **316** als gelb-brauner Feststoff

Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

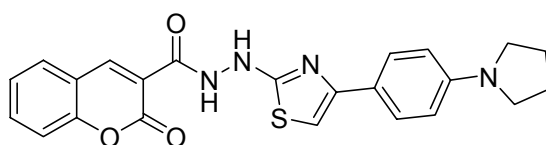
11.14.11.24 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)2-oxo-2*H*-chromen-3-carbhydrazid (**317**)



Ausbeute: 86 mg (42%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)2-oxo-2*H*-chromen-3-carbhydrazid **317** als orangener Feststoff

Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

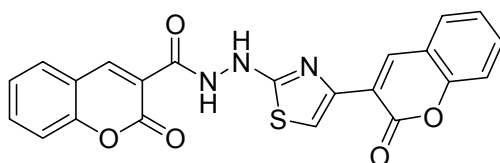
11.14.11.25 Herstellung von 2-Oxo-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-2*H*-chromen-3-carbhydrazid (**318**)



Ausbeute: 82 mg (38%) von 2-Oxo-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-2*H*-chromen-3-carbhydrazid **318** als brauner Feststoff

Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

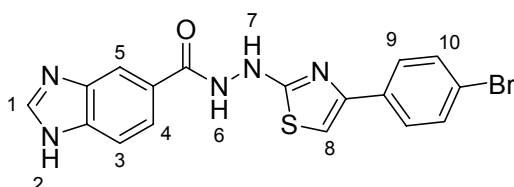
11.14.11.26 Herstellung von 2-Oxo-*N'*-(4-(2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-2*H*-chromen-3-carbhydrazid (**319**)



Ausbeute: 82 mg (38%) von 2-Oxo-*N'*-(4-(2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-2*H*-chromen-3-carbhydrazid **319** als orangener Feststoff

Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

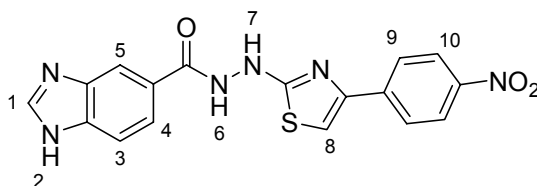
11.14.11.27 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[d]imidazol-5-carbhydrazid (**320**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 63 mg (31%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[d]imidazol-5-carbhydrazid **320** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.92 (s, 1H, 6-NH), 9.73 (s, 1H, 7-NH), 8.50 (s, 1H, 5-H), 8.29 (s, 1H, 1-H), 7.88–7.85 (m, 3H, 4-H, 10-H), 7.77 (d, 1H, 3-H, *J* = 8.3 Hz), 7.64 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.3 Hz), 7.39 (s, 1H, 8-H) ppm.

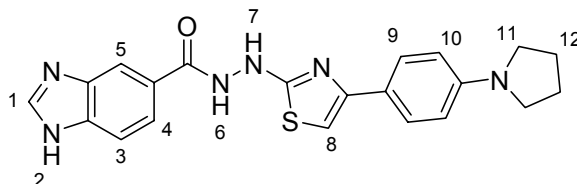
11.14.11.28 Herstellung von *N'*-(4-(4-(Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid (321)



Nach Umkristallisation aus EE werden 88 mg (31%) von *N'*-(4-(4-(Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid **321** als grün-gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.74 (s, 1H, 2-NH), 10.89 (s, 1H, 6-NH), 9.79 (s, 1H, 7-NH), 8.38–8.11 (*m*, 6H, 1-H, 3-H, 4-H, 5-H, 10-H), 7.80–7.64 (*m*, 3H, 8-H, 9-H) ppm.

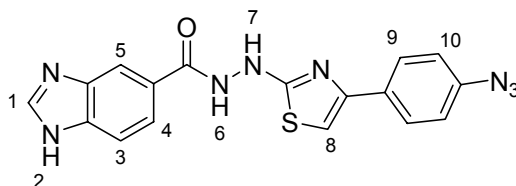
11.14.11.29 Herstellung von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid (322)



Nach Umkristallisation aus EE werden 91 mg (45%) von *N'*-(4-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid **322** als gelb-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.70 (s, 1H, 2-NH), 10.84 (s, 1H, 6-NH), 9.73 (s, 1H, 7-NH), 8.38 (s, 1H, 5-H), 8.18 (s, 1H, 1-H), 7.95–7.88 (*m*, 2H, 3-H, 4-H), 7.35 (*d*, 1H, 9-H, *J* = 8.3 Hz), 6.86 (s, 1H, 8-H), 6.54 (*d*, 1H, 10-H, *J* = 8.3 Hz), 3.21 (s, 4H, 11-H), 1.96 (s, 4H, 12-H) ppm.

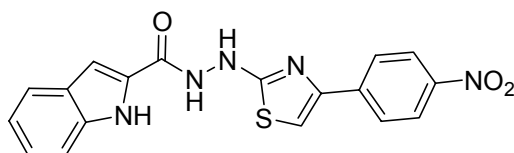
11.14.11.30 Herstellung von *N'*-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid (**323**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 52 mg (28%) von *N'*-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-carbhydrazid **323** als violetter Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.90 (s, 1H, 6-NH), 9.67 (s, 1H, 7-NH), 8.61 (s, 1H, 5-H), 8.24 (s, 1H, 1-H), 7.87–7.82 (*m*, 3H, 4-H, 9-H), 7.73 (*d*, 1H, 3-H, *J* = 8.4 Hz), 7.25 (s, 1H, 8-H), 7.13 (*d*, 2H, 10-H, *J* = 8.3 Hz) ppm.

11.14.11.31 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-indol-2-carbhydrazid (**324**)



Ausbeute: 82 mg (43%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-1*H*-indol-2-carbhydrazid **324** als gelber Feststoff

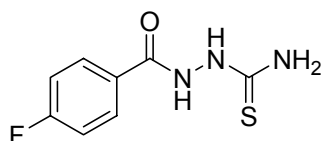
Die Substanz ist nahezu unlöslich in DMSO, CHCl₃, MeOH, weshalb keine brauchbaren Ergebnisse bei der NMR-Analytik erzielt werden konnten. Daraufhin wurde verzichtet, die Verbindung biologisch zu testen.

11.15 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 332-341

11.15.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide 328–330

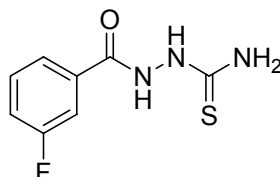
Thiosemicarbazid (**260**, 365 mg, 4 mmol) wird in ca. 4 mL trockenem Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Carbonsäurechlorid (**325–327**, 4.4 mmol) versetzt und bei RT gerührt (12 h). Überschüssiges Pyridin wird im Vakuum entfernt, so dass eine Mischung aus Rohprodukt und Pyridin-Hydrochlorid zurückbleibt. Das Gemisch wird mit Wasser gewaschen und der resultierende Feststoff in EtOH umkristallisiert.

11.15.1.1 Herstellung von Thiosemicarbazid **328**



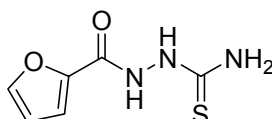
Ausbeute: 852 mg (68%) von Thiosemicarbazid **328** als farbloser Feststoff

11.15.1.2 Herstellung von Thiosemicarbazid **329**



Ausbeute: 940 mg (75%) von Thiosemicarbazid **329** als farbloser Feststoff

11.15.1.3 Herstellung von Thiosemicarbazid **330**

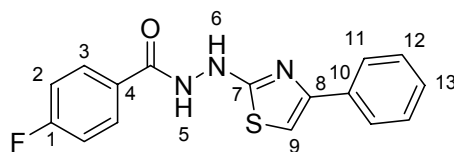


Ausbeute: 460 mg (62%) von Thiosemicarbazid **330** als farbloser Feststoff

11.15.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzhydrazide 332–341

Thiosemicarbazid (**328–330**, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**287–292**, **331**, 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE (wahlweise auch DCM) gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Der Feststoff lässt sich nur selten vollständig in Lösung bringen, was teilweise zu niedrigen Ausbeuten führt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

11.15.2.1 Herstellung von 4-Fluor-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid (**332**)

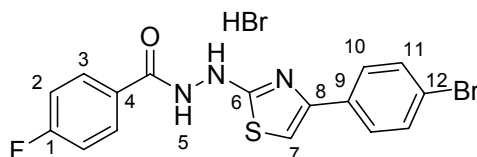


Nach Umkristallisation aus EE werden 103 mg (66%) von 4-Fluor-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid **332** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.93 (s, 1H, 5-NH), 9.70 (s, 1H, 6-NH), 8.00 (dd, 2H, 3-H, *J* = 5.6, 8.5 Hz), 7.84 (d, 2H, 11-H, *J* = 7.5 Hz), 7.41–7.36 (m, 4H, 2-H, 12-H), 7.29 (d, 1H, 13-H, *J* = 7.3 Hz), 7.26 (s, 1H, 9-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.2 (7-C), 165.1 (CONR), 164.0 (1-C), 150.3 (8-C), 134.3 (10-C), 129.9 (3-C), 128.5 (4-C), 128.2 (12-C), 127.2 (11-C), 125.2 (13-C), 115.4 (2-C), 102.8 (9-C) ppm.

11.15.2.2 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-4-fluorbenzhydrazid Hydrobromid (**333**)

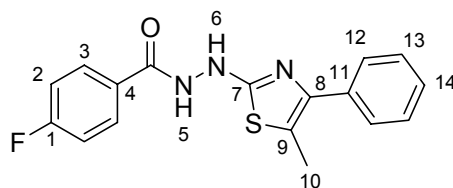


Ausbeute: 151 mg (64%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-4-fluorbenzhydrazid Hydrobromid **333** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.95 (s, 1H, 5-NH), 8.00 (dd, 2H, 3-H, *J* = 5.7, 7.9 Hz), 7.77 (d, 2H, 11-H, *J* = 8.3 Hz), 7.57 (d, 2H, 10-H, *J* = 8.3 Hz), 7.39–7.33 (m, 3H, 2-H, 8-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.4 (6-C), 165.1 (CONR), 164.0 (1-C), 148.5 (7-C), 133.1 (9-C), 131.2 (11-C), 129.9 (10-C), 128.4 (4-C), 127.4 (3-C), 120.4 (12-C), 115.5 (2-C), 103.9 (8-C) ppm.

11.15.2.3 Herstellung von 4-Fluor-*N'*-(5-methyl-4-phenylthiazol-2-yl)-benzhydrazid (**334**)

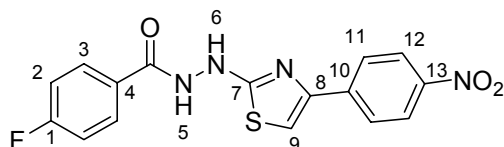


Nach Umkristallisation aus EE werden 67 mg (42%) von 4-Fluor-*N'*-(5-methyl-4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid **334** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.86 (s, 1H, 5-NH), 9.44 (s, 1H, 6-NH), 7.98 (dd, 2H, 3-H, *J* = 5.6, 8.4 Hz), 7.59 (d, 2H, 12-H, *J* = 7.4 Hz), 7.44–7.23 (m, 5H, 2-H, 13-H, 14-CH), 2.36 (s, 3H, 10-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.4 (7-C), 165.9 (CONR), 164.2 (1-C), 145.7 (8-C), 135.1 (11-C), 130.1 (13-C), 128.8 (4-C), 128.0 (3-C), 126.9 (12-C), 116.7 (9-C), 115.6 (2-C), 12.1 (10-C) ppm.

11.15.2.4 Herstellung von 4-Fluor-*N'*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (335)

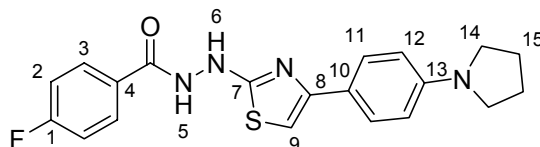


Nach Umkristallisation aus EE werden 77 mg (43%) von 4-Fluor-*N'*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **335** als gelber Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.98 (s, 1H, 5-NH), 9.86 (s, 1H, 6-NH), 8.26 (d, 2H, 12-H, J = 8.7 Hz), 8.09 (d, 2H, 11-H, J = 8.6 Hz), 8.00–7.97 (m, 2H, 3-H), 7.65 (s, 1H, 9-H), 7.39 (t, 2H, 2-H, J = 8.5 Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 172.6 (7-C), 165.1 (CONR), 162.4 (1-C), 148.2 (8-C), 145.9 (13-C), 140.2 (10-C), 129.9 (11-C), 128.3 (4-C), 126.0 (3-C), 123.8 (12-C), 115.5 (2-C), 107.9 (9-C) ppm.

11.15.2.5 Herstellung von 4-Fluor-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (336)



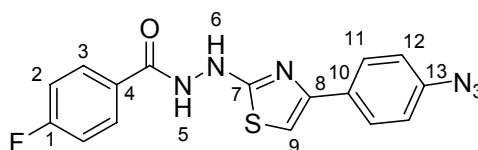
Nach Umkristallisation aus EE werden 105 mg (55%) von 4-Fluor-*N'*-(4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **336** als brauner Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.91 (s, 1H, 5-NH), 9.59 (s, 1H, 6-NH), 8.02 (dd, 2H, 3-H, J = 5.5, 8.9 Hz), 7.67 (d, 2H, 11-H, J = 8.7 Hz), 7.40 (t, 2H, 2-H, J = 8.9 Hz),

6.90 (s, 1 H, 9-H), 6.55 (d, 1H, 12-H, $J = 8.8$ Hz), 3.26 (s, 4H, 14-H), 1.97 (s, 4H, 15-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.8$ (7-C), 165.1 (CONR), 163.6 (1-C), 151.2 (8-C), 146.7 (13-C), 129.9 (3-C), 128.6 (4-C), 126.3 (11-C), 121.9 (10-C), 115.4 (2-C), 111.2 (11-C), 98.3 (9-C), 46.9 (14-C), 24.6 (15-C) ppm.

11.15.2.6 Herstellung von *N'*-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-4-fluorbenzhydrazid (**337**)

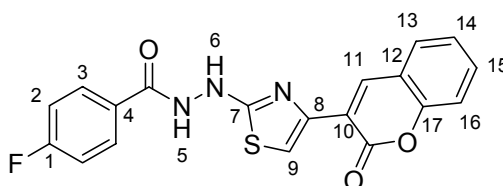


Nach Umkristallisation aus EE werden 102 mg (58%) von *N'*-(4-(4-Azidphenyl)thiazol-2-yl)-4-fluorbenzhydrazid **337** als violetter Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.93$ (s, 1H, 5-NH), 9.71 (s, 1H, 6-NH), 7.99 (dd, 2H, 3-H, $J = 5.5, 8.6$ Hz), 7.88 (d, 2H, 11-H, $J = 8.5$ Hz), 7.38 (t, 2H, 2-H, $J = 8.8$ Hz), 7.26 (s, 1H, 9-H), 7.14 (d, 1H, 12-H, $J = 8.5$ Hz) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 173.4$ (7-C), 166.2 (CONR), 165.1 (1-C), 150.6 (8-C), 139.1 (13-C), 132.5 (12-C), 130.9 (3-C), 129.6 (4-C), 127.9 (11-C), 120.1 (10-C), 116.5 (2-C), 103.8 (9-C) ppm.

11.15.2.7 Herstellung von 4-Fluor-*N'*-(4-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (**338**)

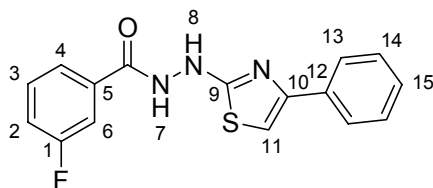


Nach Umkristallisation aus EE werden 102 mg (36%) von 4-Fluor-*N'*-(4-(2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **338** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.99 (s, 1H, 5-NH), 9.78 (s, 1H, 6-NH), 8.96 (s, 1H, 11-H), 8.03–7.98 (*m*, 2H, 3-H), 7.87 (*d*, 1H, 13-H, *J* = 7.5 Hz), 7.70 (s, 1H, 9-H), 7.60 (*dd*, 1H, 15-H, *J* = 7.8, 15.2 Hz), 7.45–7.36 (*m*, 4H, 2-H, 14-H, 16-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.1 (7-C), 165.8 (1-C), 158.7 (CONR), 152.2 (COOR), 149.5 (17-C), 146.2 (11-C), 144.0 (8-C), 135.8 (4-C), 131.1 (10-C), 130.1 (3-C), 128.9 (15-C), 127.7 (13-C), 125.5 (14-C), 124.6 (16-C), 120.4 (12-C), 115.6 (2-C), 110.0 (9-C) ppm.

11.15.2.8 Herstellung von 2-Fluor-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid (**339**)

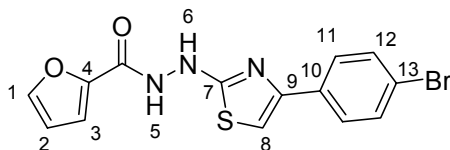


Nach Umkristallisation aus EE werden 68 mg (43%) von 2-Fluor-*N'*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzhydrazid **339** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.71 (s, 1H, 7-NH), 9.74 (s, 1H, 8-NH), 7.86 (*d*, 2H, 13-H, *J* = 4.8 Hz), 7.66–7.64 (*m*, 2H, 4-H, 6-H), 7.38–7.28 (*m*, 6H, 2-H, 3-H, 11-H, 14-H, 15-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.4 (8-C), 164.5 (CONR), 159.6 (1-C), 151.1 (10-C), 135.1 (5-C), 133.5 (12-C), 130.3 (3-C), 128.9 (14-C), 127.9 (15-C), 126.0 (12-C), 125.1 (4-C), 122.6 (2-C), 116.8 (6-C), 103.7 (11-C) ppm.

11.15.2.9 Herstellung von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)furan-2carbhydrazid (**340**)

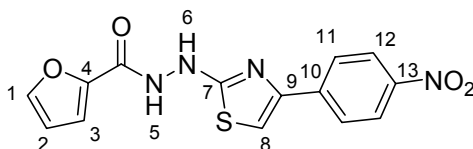


Nach Umkristallisation aus EE werden 126 mg (69%) von *N'*-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)furan-2carbhydrazid **340** als braun-gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.78 (s, 1H, 5-NH), 9.67 (s, 1H, 6-NH), 7.93 (s, 1H, 1-H), 7.78 (d, 2H, 12-H, *J* = 7.8 Hz), 7.57 (d, 2H, 11-H, *J* = 7.9 Hz), 7.32–7.30 (m, 2H, 2-H, 3-H), 6.69 (s, 1H, 8-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.1 (7-C), 157.5 (CONR), 149.0 (9-C), 145.7 (1-C), 145.5 (4-C), 133.4 (10-C), 131.1 (12-C), 127.2 (11-C), 120.1 (13-C), 114.6 (3-C), 111.5 (2-C), 103.6 (8-C) ppm.

11.15.2.10 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)furan-2carbhydrazid (**341**)



Nach Umkristallisation aus EE werden 116 mg (70%) von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)furan-2carbhydrazid **341** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.82 (s, 1H, 5-NH), 9.79 (s, 1H, 6-NH), 8.26 (d, 2H, 12-H, *J* = 8.6 Hz), 8.88 (d, 2H, 11-H, *J* = 8.7 Hz), 7.94 (s, 1H, 8-H), 7.63 (s, 1H, 8-H), 7.30 (d, 1H, 3-H, *J* = 2.9 Hz), 6.70 (s, 1H, 2-H) ppm.

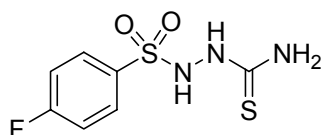
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.9 (7-C), 158.0 (CONR), 148.7 (9-C), 146.4 (13-C), 146.3 (1-C), 146.0 (4-C), 140.7 (10-C), 126.5 (11-C), 124.2 (12-C), 115.2 (3-C), 112.1 (2-C), 108.1 (8-C) ppm.

11.16 Synthese der Phenylthiazolbenzulfonhydrazid 346/347

11.16.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Thiosemicarbazide 344/345

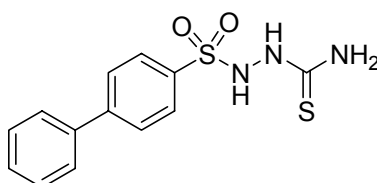
Thiosemicarbazid (**260**, 183 mg, 2 mmol) wird in ca. 2 mL trockenem Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Sulfonylchlorid (**342/343**, 2.2 mmol) versetzt und bei RT gerührt (12 h). Überschüssiges Pyridin wird im Vakuum entfernt, so dass eine Mischung aus Rohprodukt und Pyridin-Hydrochlorid zurückbleibt. Das Gemisch wird mit Wasser gewaschen und der resultierende Feststoff in EtOH umkristallisiert.

11.16.1.1 Herstellung von Thiosemicarbazid (344)



Ausbeute: 284 mg (57%) von Thiosemicarbazid **344** als farbloser Feststoff

11.16.1.2 Herstellung von Thiosemicarbazid (345)

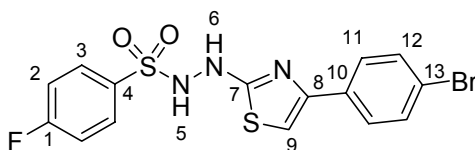


Ausbeute: 400 mg (65%) von Thiosemicarbazid **345** als farbloser Feststoff

11.16.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid 346/347

Thiosemicarbazid (**344/345**, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**288/289** 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

11.16.2.1 Herstellung von Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid 346

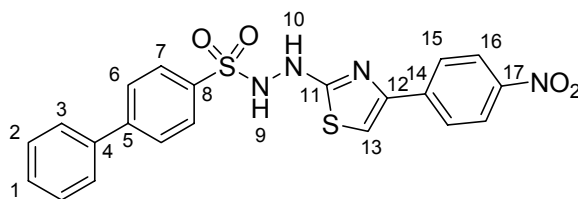


Nach Umkristallisation aus EE werden 143 mg (67%) von Phenylthiazolbenzsulfonhydrazid **346** als braun-gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.37 (s, 1H, 5-NH), 9.71 (s, 1H, 6-NH), 7.93 (s, 2H, 3-H), 7.71 (d, 2H, 12-H, *J* = 7.9 Hz), 7.56 (d, 2H, 11-H, *J* = 8.0 Hz), 7.50–7.45 (m, 2H, 2-H), 7.34 (s, 1H, 9-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.4 (7-C), 165.0 (1-C), 150.1 (8-C), 135.0 (4-C), 132.2 (12-C), 131.8 (10-C), 131.6 (11-C), 128.3 (3-C), 121.3 (13-C), 117.1 (2-C), 105.6 (9-C) ppm.

11.16.2.2 Herstellung von Phenylthiazolbenzulfonhydrazid **347**



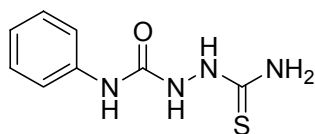
Nach Umkristallisation aus EE werden 45 mg (20%) von Phenylthiazolbenzulfonhydrazid **347** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.41 (s, 1H, 9-NH), 9.85 (s, 1H, 10-NH), 8.21 (*d*, 2H, 16-H, *J* = 8.8 Hz), 7.99 (*d*, 2H, 15-H, *J* = 8.8 Hz), 7.92 (s, 4H, 6-H, 7-H), 7.71 (*d*, 2H, 3-H, *J* = 7.1 Hz), 7.64 (s, 1H, 13-H), 7.53–7.41 (*m*, 3H, 1-H, 2-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0 (11-C), 148.4 (12-C), 146.1 (17-C), 144.7 (5-C), 140.5 (14-C), 138.4 (8-C), 136.9 (4-C), 129.1 (2-C), 128.6 (15-C), 128.5 (6-C), 127.3 (3-C), 127.0 (7-C), 126.3 (1-C), 124.0 (16-C), 108.7 (13-C) ppm.

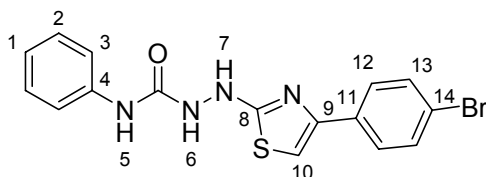
11.17 Synthese der Semicarbazide 350/351

11.17.1 Herstellung von Thiosemicarbazid **349**



Phenylisocyanat (**348**, 390 μ l, 3.6 mmol) wird in 6 mL THF suspendiert, mit Thiosemicarbazid (**260**, 273 mg, 3 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (2 h). Beim Abkühlen des Reaktionsgemisches fällt ein farbloser Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 520 mg (82%) von Thiosemicarbazid **349** als farbloser Feststoff erhalten.

11.17.2 Herstellung von 1-(4-(4-Bromphenyl)thiazol-2-yl)-4-phenylsemicarbazid (**350**)



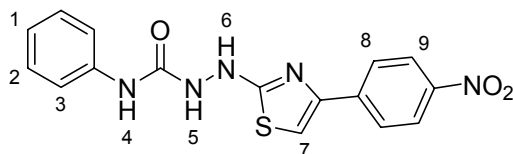
Thiosemicarbazid (**349**, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**288**, 0.5 mmol) versetzt und am Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 120 mg (62%) von Semicarbazid **350** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.46 (s, 1H, 6-NH), 8.99 (s, 1H, 5-NH), 8.74 (s, 1H, 7-NH), 7.80 (d, 2H, 13-H, *J* = 8.3 Hz), 7.58 (d, 2H, 12-H, *J* = 8.4 Hz), 7.54 (d, 2H, 3-H, *J* = 8.1 Hz), 7.35 (s, 1H, 10-H), 7.25 (t, 2H, 2-H, *J* = 7.7 Hz), 6.96 (t, 1H, 1-H, *J* = 7.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.7 (8-C), 155.6 (CONR), 149.5 (9-C), 139.4 (4-C), 133.9 (11-C), 131.5 (13-C), 128.5 (12-C), 127.5 (2-C), 122.0 (1-C), 120.4 (14-C), 118.9 (2-C), 104.2 (10-C) ppm.

11.17.3 Herstellung von 1-(4-(4-(Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-4-phenylsemicarbazid (351)

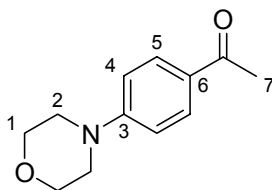


Ausbeute: 43 mg (24%) von Semicarbazid **351** als gelber Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.58 (s, 1H, 5-NH), 9.03 (s, 1H, 4-NH), 8.78 (s, 1H, 6-NH), 8.27 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.7 Hz), 8.1 (d, 2H, 8-H, *J* = 8.7 Hz), 7.67 (s, 1H, 7-H), 7.53 (d, 2H, 3-H, *J* = 7.9 Hz), 7.25 (t, 2H, 2-H, *J* = 7.8 Hz), 6.96 (t, 1H, 1-H, *J* = 7.3 Hz) ppm.

11.18 Synthese der Phenylthiazolbenzhydrazide 357/358

11.18.1 Herstellung von 1-(4-Morpholinphenyl)ethanon (354)

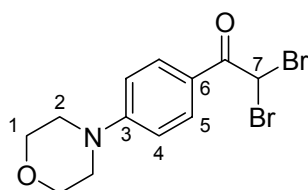


Morpholin (**353**, 1.7 mL, 20 mmol) wird in 50 mL DMSO gelöst, mit 4-Fluoracetophenon (**352**, 2.4 mL, 20 mmol) und TEA (2.4 mL, 24 mmol) versetzt und bei 140°C erhitzt (ca. 12 h). Der Ansatz wird mit Eiswasser versetzt, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 2.30 g (56%) von 1-(4-Morpholinphenyl)ethanon **354** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.00 (*d*, 2H, 5-H, J = 8.8 Hz), 6.80 (*d*, 2H, 4-H, J = 8.8 Hz), 3.87–3.84 (*m*, 4H, 1-H), 3.38–3.35 (*m*, 4H, 2-H), 2.55 (*s*, 3H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 196.4 (C=O), 154.1 (3-C), 130.3 (5-C), 128.1 (6-C), 113.6 (4-C), 66.5 (1-C), 47.4 (2-C), 26.1 (C) ppm.

11.18.2 Herstellung von 2,2-Dibrom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon (355)

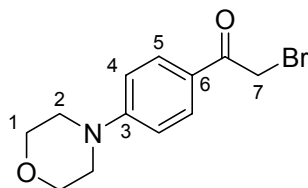


1-(4-Morpholinphenyl)ethanon (**354**, 2.30 g, 11.2 mmol) wird in konz. H_2SO_4 gelöst und tropfenweise bei 0°C mit Br_2 (570 μL , 11.8 mmol) versetzt. Der Ansatz wird bei RT für ca. 6 h gerührt, auf Eiswasser gegeben, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 1.71 g (42%) von 2,2-Dibrom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon **355** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.01 (*d*, 2H, 5-H, J = 8.8 Hz), 6.87 (*d*, 2H, 4-H, J = 8.8 Hz), 6.67 (*s*, 1H, 7-H), 3.87–3.84 (*m*, 4H, 1-H), 3.38–3.35 (*m*, 4H, 2-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 183.9 (C=O), 154.5 (3-C), 131.8 (5-C), 120.1 (6-C), 112.8 (4-C), 66.2 (1-C), 46.7 (2-C), 40.0 (7-C) ppm.

11.18.3 Herstellung von 2-Brom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon (**356**)

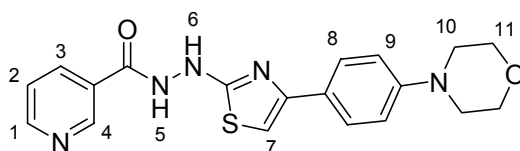


2,2-Dibrom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon (**355**, 1.71 g, 4.68 mmol) wird in 10 mL THF gelöst und mit Diethylphosphit (663 μ L, 5.15 mmol) und TEA (714 μ L, 5.15 mmol) versetzt. Der Ansatz wird bei RT gerührt (12 h) und anschließend mit dest. H₂O (20 mL) versetzt. Das Gemisch wird mit CHCl₃ (3 x 25 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl₃) werden 1.06 g (80%) von 2-Brom-1-(4-morpholinphenyl)ethanon **356** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.84 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 9.0 Hz), 6.80 (*d*, 2H, 4-H, *J* = 9.0 Hz), 4.30 (*s*, 2H, 7-H), 3.78–3.77 (*m*, 4H, 1-H), 3.28–3.25 (*m*, 4H, 2-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 189.5 (C=O), 154.5 (3-C), 131.1 (5-C), 124.3 (6-C), 113.1 (4-C), 66.4 (1-C), 47.1 (2-C), 30.7 (7-C) ppm.

11.18.4 Herstellung von N'-(4-(4-Morpholinphenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid (**357**)

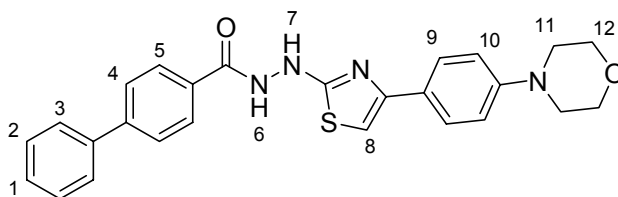


Thiosemicarbazid (**280**, 98 mg, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**356**, 142 mg, 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH

gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus EE werden 105 mg (55%) von *N'*-(4-(4-Morpholinphenyl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid **357** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.05 (s, 1H, 5-NH), 9.66 (s, 1H, 6-NH), 9.05 (s, 1H, 4-H), 8.77 (s, 1H, 1-H), 8.22 (s, 1H, 3-H), 7.88–7.57 (*m*, 3H, 2-H, 8-H), 7.02–6.79 (*m*, 3H, 7-H, 9-H), 3.72 (s, 4H, 11-H), 3.10 (s, 4H, 10-H) ppm.

11.18.5 Herstellung von Biphenyl-*N'*-(4-(4-morpholinphenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid (**358**)

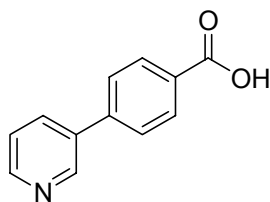


Nach Umkristallisation aus EE werden 48 mg (32%) von Biphenyl-*N'*-(4-(4-morpholinphenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid **358** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.92 (s, 1H, 6-NH), 9.60 (s, 1H, 7-NH), 8.01 (*d*, 2H, 5-H, *J* = 8.0 Hz), 7.83 (*d*, 2H, 4-H, *J* = 8.1 Hz), 7.75 (*d*, 2H, 3-H, *J* = 7.4 Hz), 7.70 (*d*, 2H, 9-H, *J* = 8.4 Hz), 7.50 (*t*, 2H, 2-H, *J* = 7.4 Hz), 7.44–7.39 (*m*, 1H, 1-H), 7.01 (s, 1H, 8-H), 6.94 (*d*, 2H, 10-H, *J* = 8.5 Hz), 3.73 (s, 4H, 12-H), 3.12 (s, 4H, 11-H) ppm.

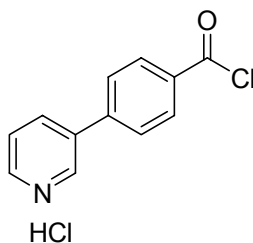
11.19 Synthese des Phenylthiazolbenzhydrazides **364**

11.19.1 Herstellung von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäure (**361**)



4-Carboxyphenylboronsäure (**359**, 365 mg, 2.2 mmol), 3-Brompyridin (**360**, 316 mg, 2 mmol) und K_2CO_3 (553 mg, 4 mmol) in 10 mL H_2O werden unter Argonatmosphäre in 10 mL CH_3CN aufgenommen, mit Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium (35 mg, 0.03 mmol) versetzt und bei 90°C erhitzt (16 h). Die heiße Suspension wird filtriert, unter Vakuum vom Acetonitril befreit und mit CHCl_3 (2 x 10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wird angesäuert, wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus H_2O werden 314 mg von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäure **361** als farbloser Feststoff erhalten.

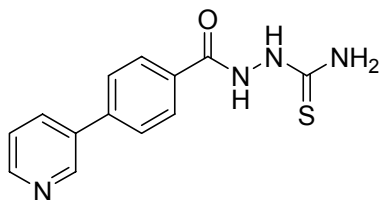
11.19.2 Herstellung von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäurechlorid-Hydrochlorid (**362**)



4-(Pyridin-3-yl)benzoesäure (**361**, 310 mg, 1.56 mmol) wird in 3 mL Toluol suspendiert, mit 2 Tropfen DMF und Thionylchlorid (226 μL , 3.11 mmol) versetzt und unter Rückfluss für 2 h erhitzt. Der Ansatz wird unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit und unter HV getrocknet. Verbindung **362** wird ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

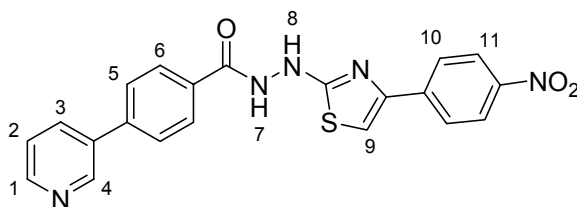
Ausbeute: 359 mg (90%) von 4-(Pyridin-3-yl)benzoesäurechlorid-Hydrochlorid **362** als farbloser Feststoff

11.19.3 Herstellung von Thiosemicarbazid **363**



Thiosemicarbazid (**260**, 109 mg, 1.2 mmol) wird in ca. 3 mL trockenem Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Carbonsäurechlorid (**362**, 359 mg, 1.4 mmol) versetzt und bei RT gerührt (12 h). Überschüssiges Pyridin wird im Vakuum entfernt, so dass eine Mischung aus Rohprodukt und Pyridin-Hydrochlorid zurückbleibt. Nach Umkristallisation aus EtOH/Wasser werden 294 mg von Thiosemicarbazid **363** als farbloser Feststoff erhalten.

11.19.4 Herstellung von *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-4-(pyridin-3-yl)benzhydrazid (**364**)

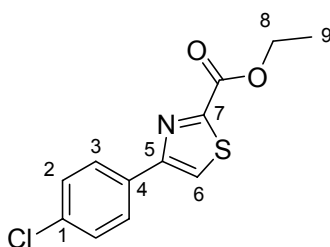


Thiosemicarbazid (**363**, 136 mg, 0.5 mmol) wird in ca. 3 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**289**, 122 mg, 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff (Hydrobromid des Phenylthiazolbenzhydrazides) ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Zur Überführung des Rohproduktes in die salzfreie Form wird der Feststoff in EE gelöst/suspendiert und mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus EE werden 109 mg (52%) *N'*-(4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)-4-(pyridin-3-yl)benzhydrazid **364** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.07 (s, 1H, 7-NH), 9.88 (s, 1H, 8-NH), 8.98 (s, 1H, 4-H), 8.62 (d, 1H, 1-H, *J* = 3.9 Hz), 8.26 (d, 2H, 11-H, *J* = 8.7 Hz), 8.17 (d, 1H, 3-H, *J* = 7.8 Hz), 8.09 (d, 2H, 10-H, *J* = 8.7 Hz), 8.05 (d, 2H, 6-H, *J* = 8.3 Hz), 7.91 (d, 2H, 5-H, *J* = 8.1 Hz), 7.66 (s, 1H, 9-H), 7.53 (dd, 1H, 2-H, *J* = 4.8, 7.6 Hz) ppm.

11.20 Synthese des Thiazols 370

11.20.1 Herstellung von Ethyl-4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-carboxylat (367)

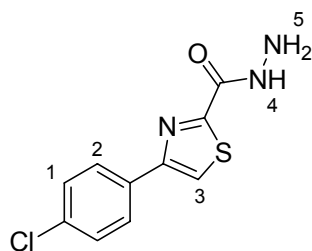


Thioxamidsäureethylester (**365**, 266 mg, 2 mmol) wird in ca. 5 mL EtOH gelöst, mit Bromacetophenon (**366**, 467 mg, 2 mmol) versetzt und unter Rückfluss erhitzt (30 min). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 482 mg (90%) von Ethyl-4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-carboxylat **367** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.57 (s, 1H, 6-H), 7.95 (d, 2H, 3-H, *J* = 8.5 Hz), 7.67 (d, 2H, 2-H, *J* = 8.5 Hz), 4.41 (q, 2H, 8-H, *J* = 7.1 Hz), 1.35 (t, 3H, 9-H, *J* = 7.1 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159.3 (7-C), 157.7 (COOR), 154.8 (5-C), 132.4 (1-C), 131.9 (2-C), 128.2 (3-C), 121.9 (4-C), 121.6 (6-C), 69.2 (8-C), 14.0 (9-C) ppm.

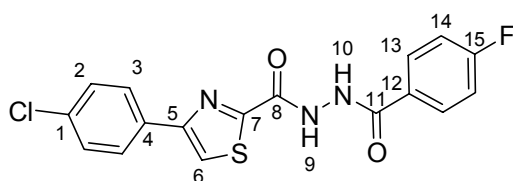
11.20.2 Herstellung von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-carbhydrazid (368)



Ethyl-4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-carboxylat (**367**, 482 mg, 1.8 mmol) wird in 4 mL EtOH gelöst, mit Hydrazinhydrat (262 mg, 5.4 mmol) versetzt und unter Rückfluss über Nacht gerührt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 434 mg (95%) von 4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-carbhydrazid **368** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.20 (s, 1H, 4-NH), 8.42 (s, 1H, 3-H), 8.10 (d, 2H, 2-H, *J* = 8.6 Hz), 7.53 (d, 2H, 1-H, *J* = 8.6 Hz), 4.71 (breites s, 2H, 5-NH₂) ppm.

11.20.3 Herstellung von Thiazol 369

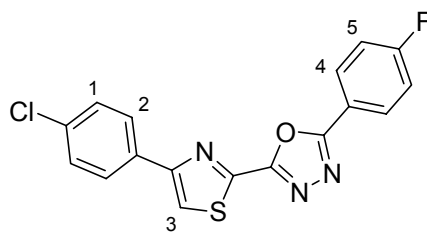


4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-carbohydrazid (**368**, 434 mg, 1.7 mmol) wird in 3 mL Pyridin gelöst, mit 4-Fluorbenzoylchlorid (**325**, 216 μ L, 1.8 mmol) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Ansatz wird unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in EE gelöst (25 mL) und mit 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 15 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 15 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 447 mg (70%) von Thiazol **369** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.98 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, 6-H), 8.16 (d, 2H, 3-H, J = 8.6 Hz), 8.0 (dd, 2H, 13-H, J = 5.5, 8.8 Hz), 7.57 (d, 2H, 2-H, J = 8.6 Hz), 7.37 (t, 2H, 14-H, 8.8 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 164.2 (15-C), 164.6 (8-CONR), 161.5 (11-CONR), 158.5 (7-C), 154.2 (5-C), 133.2 (1-C), 132.2 (4-C), 130.2 (2-C), 130.1 (12-C), 128.9 (13-C), 128.0 (3-C), 120.5 (6-C), 115.6 (14-C) ppm.

11.20.4 Herstellung von 2-(4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-yl)-5-(4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadizol (370)



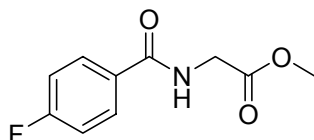
Thiazol (**369**, 447 mg, 1.2 mmol) wird in 5 mL Diethylether suspendiert, bei 0°C mit Pyridin (252 μL , 3.1 mmol) und Thionylchlorid (114 μL , 1.6 mmol) versetzt und bei dieser Temperatur gerührt (1 h). Der Ansatz wird filtriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Toluol (5 mL) gelöst und unter Rückfluss erhitzt (2 h), wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und am HV getrocknet.

Ausbeute: 150 mg (35%) von 2-(4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-yl)-5-(4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadizol **370** als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.16 (dd, 2H, 4-H, J = 5.3, 8.6 Hz), 7.87 (d, 2H, 2-H, J = 8.5 Hz), 7.66 (s, 1H, 3-H), 7.38 (d, 2H, 1-H, J = 8.4 Hz), 7.18 (dd, 2H, 5-H, 7.6, 9.4 Hz) ppm.

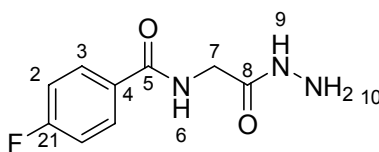
11.21 Synthese des Oxadiazols 375

11.21.1 Herstellung von Methyl-2-(4-fluorbenzamid)acetat (372)



Glycinmethylester-Hydrochlorid (**371**, 502 mg, 4 mmol) wird in 6 mL Pyridin gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 4-Fluorbenzoylchlorid (**325**, 528 μ L, 4.4 mmol) versetzt. Der Ansatz wird bei RT gerührt (12 h) und anschließend unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und mit 0.1N HCl-Lsg. (3 x 20 mL), 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan werden 596 mg (70%) von Methyl-2-(4-fluorbenzamid)acetat **372** als farbloser Feststoff erhalten.

11.21.2 Herstellung von 2-(4-Fluorbenzamid)acethydrazid (373)

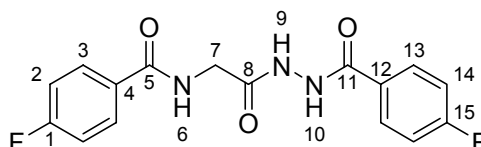


Methyl-2-(4-fluorbenzamid)acetat (**372**, 596 mg, 2.8 mmol) wird in 6 mL EtOH gelöst, mit Hydrazinhydrat (680 μ L, 14 mmol) versetzt und unter Rückfluss über Nacht gerührt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und mit kaltem EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation aus EtOH werden 503 mg (85%) von 2-(4-Fluorbenzamid)acethydrazid **373** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.13 (s, 1H, 6-NH), 8.75 (t, 1H, 9-NH, J = 5.5 Hz), 7.94 (dd, 2H, 3-H, J = 5.7, 8.5 Hz), 7.28 (t, 2H, 2-H, J = 8.8 Hz), 4.20 (s, 2H, 7-H), 3.82 (d, 2H, 10-NH₂, J = 5.8 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.3 (8-CONR), 165.4 (5-CONR), 162.2 (1-C), 130.5 (4-C), 129.9 (3-C), 115.1 (1-C), 41.4 (7-C) ppm.

11.21.3 Herstellung von Hydrazid **374**

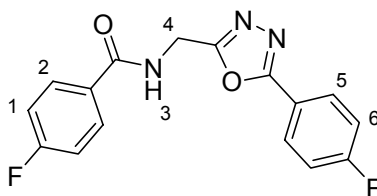


2-(4-Fluorbenzamid)acetylhydrazid (**373**, 503 mg, 2.4 mmol) wird in 5 mL Pyridin gelöst, mit 4-Fluorbenzoylchlorid (**325**, 302 μL , 2.5 mmol) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Ansatz wird unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in EE gelöst (30 mL) und mit 0.1N NaOH-Lsg. (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus EE/*n*-Hexan werden 560 mg (70%) von Hydrazid **374** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.42 (s, 1H, NH), 10.09 (s, 1H, NH), 8.90 (t, 1H, 6-NH, J = 5.3 Hz), 7.99–7.92 (m, 4H, 3-H, 13-H), 7.34–7.28 (m, 4H, 2-H, 14-H), 4.00 (d, 2H, 7-H, J = 5.5 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.4 (8-CONR), 165.5 (5-CONR), 164.4 (11-CONR), 162.5 (1-C), 162.3 (15-C), 130.5 (4-C), 130.2 (3-C), 130.0 (13-C), 128.9 (12-C), 115.6 (2-C), 115.2 (14-C), 41.2 (7-C) ppm.

11.21.4 Herstellung von 4-Fluor-*N*-((4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)benzamid (**375**)



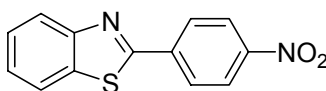
Hydrazid (**374**, 560 mg, 1.7 mmol) wird in 8 mL Diethylether suspendiert, bei 0°C mit Pyridin (357 μ L, 4.4 mmol) und Thionylchlorid (161 μ L, 2.2 mmol) versetzt und bei dieser Temperatur gerührt (1 h). Der Ansatz wird filtriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Toluol (8 mL) gelöst und unter Rückfluss erhitzt (2 h), wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert und am HV getrocknet.

Ausbeute: 107 mg (20%) von 4-Fluor-*N*-((4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)benzamid **375** als farbloser Feststoff

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.33 (s, 1H, 3-NH), 8.04–7.93 (*m*, 4H, 2-H, 5-H), 7.42 (*t*, 2H, 1-H, *J* = 8.2 Hz), 7.32 (*t*, 2H, 6-H, *J* = 8.0 Hz), 4.77 (*d*, 2H, 4-H, *J* = 4.1 Hz) ppm.

11.22 Synthese der Benzothiazole 387-393

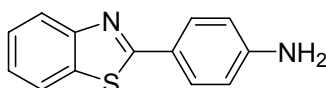
11.22.1 Herstellung von 2-(4-Nitrophenyl)benzo[*d*]thiazol (**378**)



2-Aminothiophenol (**376**, 1.6 mL, 15 mmol) wird in 15 mL NMP gelöst und unter Eiskühlung mit 4-Nitrobenzoylchlorid (**377**, 2.80 g, 15 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei 100°C gerührt (1 h), auf RT abgekühlt, mit dest. Wasser versetzt und mit einer wässrigen Ammoniak-Lsg. auf pH 8-9 gebracht. Es fällt ein gelber Feststoff aus, dieser wird abfiltriert und mit kaltem MeOH gewaschen.

Ausbeute: 3.70 g (96%) von 2-(4-Nitrophenyl)benzo[d]thiazol **378** als gelber Feststoff.

11.22.2 Herstellung von 4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)benzenamin (**379**)

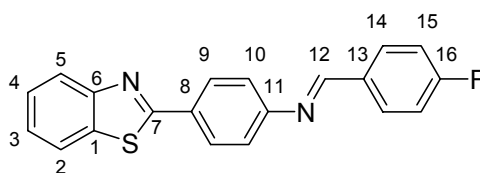


2-(4-Nitrophenyl)benzo[d]thiazol (**378**, 1.30 g, 5 mmol) wird in 20 mL EtOH suspendiert, mit Zinnchlorid-Dihydrat versetzt und unter Rückfluss erhitzt (2 h). Der Ansatz wird auf RT abgekühlt und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in EE gelöst und mit 2N NaOH-Lsg. (3 x 20 mL), dest. H₂O (2 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisation aus EtOH wurden 826 mg (73%) von 4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)benzenamin **379** als gelber Feststoff erhalten.

11.22.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Benzothiazole **387-393**

4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)benzenamin (**379**, 113 mg, 0.5 mmol) wird in 3 mL MeOH gelöst, mit Aldehyd (**380-386**, 0.5 mmol) versetzt und unter Rückfluss gerührt (1 h). Beim Abkühlen auf RT fällt ein Feststoff aus, dieser wird abfiltriert, mit kaltem MeOH gewaschen und unter HV getrocknet.

11.22.3.1 Herstellung von *N*-(4-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[d]thiazol-2-yl)benzenamin (**387**)

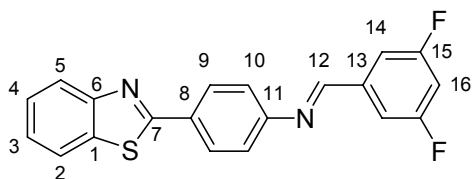


Nach Umkristallisation aus MeOH werden 139 mg (85%) von *N*-(4-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **387** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.35 (s, 1H, 12-H), 8.00 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.3 Hz), 7.94 (d, 1H, 5-H, *J* = 8.8 Hz), 7.74 (d, 1H, 2-H, *J* = 7.8 Hz), 7.60 (d, 2H, 14-H, *J* = 8.3 Hz), 7.40 (t, 1H, 4-H, *J* = 7.5 Hz), 7.28 (t, 1H, 3-H, *J* = 7.5 Hz), 7.01 (d, 2H, 15-H, *J* = 8.3 Hz), 6.90 (d, 2H, 10-H, *J* = 8.4 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.4 (7-C), 164.0 (16-C), 160.9 (12-C), 154.4 (6-C), 153.2 (11-C), 135.8 (1-C), 131.5 (8-C), 131.0 (14-C), 129.4 (13-C), 128.5 (9-C), 128.0 (3-C), 126.3 (4-C), 124.5 (2-C), 123.0 (5-C), 121.8 (10-C), 116.4 (15-C) ppm.

11.22.3.2 Herstellung von *N*-(3,5-Difluorbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (**388**)

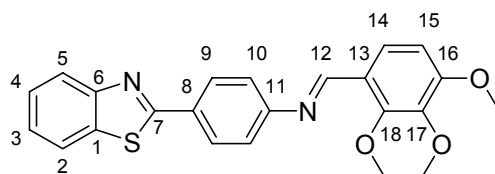


Nach Umkristallisation aus MeOH werden 120 mg (68%) von *N*-(3,5-Difluorbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **388** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.30 (s, 1H, 12-H), 8.03 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.4 Hz), 7.96 (d, 1H, 5-H, *J* = 8.9 Hz), 7.79 (d, 1H, 2-H, *J* = 7.9 Hz), 7.42–7.26 (m, 4H, 3-H, 4-H, 14-H), 7.20 (d, 2H, 10-H, *J* = 8.4 Hz), 6.84 (t, 1H, 16-H, *J* = 8.6 Hz) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (7-C), 164.8 (C-F), 161.5 (C-F), 158.5 (12-C), 154.2 (6-C), 153.1 (11-C), 139.2 (13-C), 135.0 (1-C), 131.9 (8-C), 128.6 (9-C), 126.3 (3-C), 125.2 (4-C), 123.2 (10-C), 121.5 (2-C, 5-C), 111.6 (14-C), 107.1 (16-C) ppm.

11.22.3.3 Herstellung von *N*-(2,3,4-Trimethoxybenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (389)

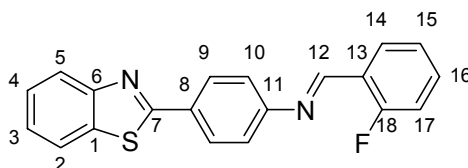


Nach Umkristallisation aus MeOH werden 128 mg (68%) von *N*-(2,3,4-Trimethoxybenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **389** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.78 (s, 1H, 12-H), 8.12 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.1 Hz), 8.07 (d, 1H, 5-H, *J* = 8.1 Hz), 7.94–7.88 (m, 2H, 2-H, 14-H), 7.49 (t, 1H, 4-H, *J* = 7.6 Hz), 7.38 (t, 1H, 3-H, *J* = 7.6 Hz), 7.31 (d, 2H, 10-H, *J* = 8.1 Hz), 6.79 (d, 1H, 15-H, *J* = 8.8 Hz), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.93 (s, 3H, CH₃), 3.91 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.7 (7-C), 157.0 (6-C), 156.6 (12-C), 154.9 (16-C), 154.3 (18-C), 141.8 (17-C), 135.0 (1-C), 130.9 (8-C), 128.5 (9-C), 126.2 (3-C), 125.0 (4-C), 123.7 (14-C), 122.9 (10-C), 121.6 (2-C, 5-C), 121.5 (13-C), 107.5 (15-C), 62.0, 60.9, 56.1 (3 CH₃) ppm.

11.22.3.4 Herstellung von *N*-(2-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (390)



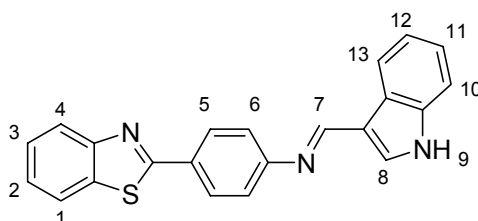
Nach Umkristallisation aus MeOH werden 122 mg (73%) von *N*-(2-Fluorbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **390** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.73 (s, 1H, 12-H), 8.11 (t, 1H, 14-H, *J* = 7.0 Hz), 8.04 (d, 2H, 9-H, *J* = 8.3 Hz), 7.99 (d, 1H, 5-H, *J* = 8.1 Hz), 7.80 (d, 1H, 2-H, *J* = 7.9

Hz), 7.42–7.37 (*m*, 2H, 15-H, 16-H), 7.29 (*t*, 1H, 4-H, $J = 7.5$ Hz), 7.24 (*d*, 2H, 10-H, $J = 8.3$ Hz), 7.17 (*t*, 1H, 3-H, $J = 7.5$ Hz), 7.08–7.04 (*m*, 1H, 17-H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.4$ (7-C), 164.0 (18-C), 161.9 (12-C), 154.0 (6-C, 11-C), 135.0 (1-C), 133.4 (16-C), 133.3 (14-C), 131.5 (8-C), 128.5 (9-C), 128.0 (3-C), 126.3 (4-C), 125.1 (15-C), 124.5 (2-C), 123.7 (13-C), 123.1 (5-C), 121.6 (10-C), 116.9 (17-C) ppm.

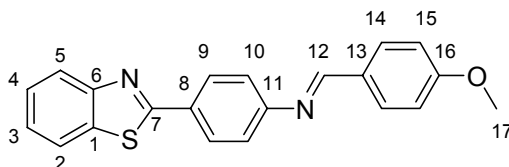
11.22.3.5 Herstellung von *N*-((1*H*-Indol-3-yl)methylen)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (391)



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 40 mg (22%) von *N*-((1*H*-Indol-3-yl)methylen)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **391** als gelber Feststoff erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.01$ (*s*, 1H, 9-NH), 8.28 (*s*, 1H, 7-H), 8.04 (*s*, 1H, 4-H), 7.66–7.33 (*m*, 6H), 7.02–6.79 (*m*, 6H, 5-H) ppm.

11.22.3.6 Herstellung von *N*-(4-Methoxybenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (392)

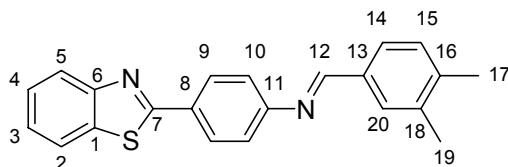


Nach Umkristallisation aus MeOH werden 160 mg (93%) von *N*-(4-Methoxybenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **392** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.33 (s, 1H, 12-H), 8.03 (d, 2H, 9-H, J = 8.4 Hz), 7.98 (d, 1H, 5-H, J = 8.3 Hz), 7.81–7.78 (m, 3H, 2-H, 14-H), 7.40 (t, 1H, 4-H, J = 7.5 Hz), 7.28 (t, 1H, 3-H, J = 7.5 Hz), 7.21 (d, 2H, 15-H, J = 8.3 Hz), 6.90 (d, 2H, 10-H, J = 8.6 Hz), 3.73 (s, 3H, 17-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.6 (7-C), 162.6 (16-C), 160.3 (12-C), 154.6 (6-C), 154.2 (11-C), 135.0 (1-C), 130.9 (14-C), 128.9 (8-C), 128.5 (9-C), 126.3 (3-C), 125.0 (4-C), 124.4 (13-C), 123.0 (10-C), 121.5 (2-C, 5-C), 114.3 (15-C), 55.4 (17-C) ppm.

11.22.3.7 Herstellung von *N*-(3,4-Dimethylbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin (**393**)



Nach Umkristallisation aus MeOH werden 134 mg (78%) von *N*-(3,4-Dimethylbenzyliden)-4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)benzenamin **393** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.46 (s, 1H, 12-H), 8.15 (d, 2H, 9-H, J = 8.2 Hz), 8.10 (d, 1H, 5-H, J = 8.2 Hz), 7.92 (d, 1H, 2-H, J = 7.7 Hz), 7.77 (s, 1H, 21-H), 7.65 (d, 1H, 14-H, J = 7.5 Hz), 7.52 (t, 1H, 4-H, J = 7.4 Hz), 7.40 (t, 1H, 3-H, J = 7.4 Hz), 7.33 (d, 2H, 10-H, J = 8.2 Hz), 7.28 (d, 1H, 15-H, J = 7.4 Hz), 2.37 (s, 6H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.2 (7-C), 159.6 (12-C), 153.2 (6-C), 152.8 (11-C), 139.7 (16-C), 135.8 (1-C), 133.6 (18-C), 132.3 (8-C), 129.6 (13-C), 128.7 (20-C), 128.3 (15-C), 127.1 (9-C), 125.6 (14-C), 124.9 (3-C), 123.6 (4-C), 121.7 (2-C, 5-C), 120.1 (10-C), 18.6, 18.2 (CH₃) ppm.

12 Literaturverzeichnis

- [1] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, 430, 631.
- [2] <http://www.alzheimer-forschung.de>.
- [3] H. Bickel, *Das Gesundheitswesen* **2000**, 62, 211.
- [4] A. Ott, M. M. Breteler, F. van Harskamp, T. Stijnen, A. Hofman, *Am. J. Epidemiol.* **1998**, 147, 574.
- [5] Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt, *Altersdemenz*, **2005**.
- [6] H. Bickel, *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* **2001**, 34, 108.
- [7] J. Hallauer, *Gesundheitsökonomie und Qualitätsmanagement* **2000**, 5, 73.
- [8] *Lexikon der Biologie Band 1, A bis Arjona*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1999**.
- [9] F. M. LaFerla, S. Oddo, *Trends Mol. Med.* **2005**, 11, 170.
- [10] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 122, 1131.
- [11] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, H. M. Wisniewski, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6084.
- [12] M. Goedert, C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 4051.
- [13] D. J. Selkoe, *Neuron* **1991**, 6, 487.
- [14] S. T. DeKosky, K. Marek, *Science* **2003**, 302, 830.
- [15] A. K. Demetriades, *J. Neurol. Sci.* **2002**, 203-204, 247.
- [16] N. C. Fox, W. R. Crum, R. I. Scallin, J. M. Stevens, J. C. Janssen, M. N. Rossor, *Lancet* **2001**, 358, 201.
- [17] K. Blennow, H. Hampel, *Lancet Neurol.* **2003**, 2, 605.
- [18] H. Hampel, A. Mitchell, K. Blennow, R. A. Frank, S. Brettschneider, L. Weller, H. J. Moller, *J. Neural. Transm.* **2004**, 111, 247.
- [19] B. Schmidt, H. A. Braun, R. Narlawar, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1677.
- [20] L. Hendriks, C. van Broeckhoven, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 237, 6.
- [21] M. B. Sherman, J. Jakana, S. Sun, P. Matsudaira, W. Chiu, M. F. Schmid, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 139.
- [22] R. Mayeux, *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 26, 81.
- [23] M. P. Mattson, *Ann. Intern. Med.* **2003**, 139, 441.
- [24] C. W. Cotman, N. C. Berchtold, *Trends Neurosci.* **2002**, 25, 295.
- [25] A. I. Bush, C. L. Masters, R. E. Tanzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 11193.
- [26] C. Courtney, D. Farrell, R. Gray, R. Hills, L. Lynch, E. Sellwood, S. Edwards, W. Hardyman, J. Raftery, P. Crome, C. Lendon, H. Shaw, P. Bentham, *Lancet* **2004**, 363, 2105.
- [27] J. S. Jacobsen, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 343.
- [28] M. C. Carlson, J. Brandt, C. Steele, A. Baker, Y. Stern, C. G. Lyketsos, *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* **2001**, 56, M567.
- [29] B. Reisberg, R. Doody, A. Stoffler, F. Schmitt, S. Ferris, H. J. Mobius, *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1333.
- [30] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, 400, 173.
- [31] B. Schmidt, *ChemBioChem* **2003**, 4, 366.

- [32] J. C. Breitner, *Neurobiol. Aging* **1996**, 17, 789.
- [33] B. Wolozin, W. Kellman, P. Ruosseau, G. G. Celesia, G. Siegel, *Arch. Neurol.* **2000**, 57, 1439.
- [34] H. Jick, G. L. Zornberg, S. S. Jick, S. Seshadri, D. A. Drachman, *Lancet* **2000**, 356, 1627.
- [35] K. Fassbender, M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther, T. Hartmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 5856.
- [36] M. Simons, P. Keller, J. Dichgans, J. B. Schulz, *Neurology* **2001**, 57, 1089.
- [37] J. Krieglstein, J. Weber, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1986**, 200, 243.
- [38] E. D. Thorsett, L. H. Latimer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 377.
- [39] D. J. Selkoe, *Nature* **1999**, 399, A23.
- [40] H. Braak, E. Braak, D. Yilmazer, R. A. de Vos, E. N. Jansen, J. Bohl, *J. Neural. Transm.* **1996**, 103, 455.
- [41] C. J. Pike, B. J. Cummings, R. Monzavi, C. W. Cotman, *Neurosci.* **1994**, 63, 517.
- [42] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353.
- [43] D. J. Selkoe, *Nat. Cell Biol.* **2004**, 6, 1054.
- [44] B. De Strooper, W. Annaert, *J. Cell Sci.* **2000**, 113, 1857.
- [45] C. A. Wilson, R. W. Doms, V. M. Lee, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1999**, 58, 787.
- [46] U. Müller, N. Cristina, Z. W. Li, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, T. Rulicke, S. Brandner, A. Aguzzi, C. Weissmann, *Cell* **1994**, 79, 755.
- [47] H. Zheng, M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, G. R. Dawson, S. Boyce, M. W. Conner, K. A. Stevens, H. H. Slunt, S. S. Sisoda, H. Y. Chen, L. H. Van der Ploeg, *Cell* **1995**, 81, 525.
- [48] N. Chow, J. R. Korenberg, X. N. Chen, R. L. Neve, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11339.
- [49] W. Q. Qiu, A. Ferreira, C. Miller, E. H. Koo, D. J. Selkoe, *J. Neurosci.* **1995**, 15, 2157.
- [50] A. Y. Hung, E. H. Koo, C. Haass, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 9439.
- [51] D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 18295.
- [52] M. Mullan, F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, L. Lannfelt, *Nat. Genet.* **1992**, 1, 345.
- [53] X. D. Cai, T. E. Golde, S. G. Younkin, *Science* **1993**, 259, 514.
- [54] M. Citron, T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, D. J. Selkoe, *Nature* **1992**, 360, 672.
- [55] D. Leung, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem* **2000**, 43, 305.
- [56] B. M. Dunn, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4431.
- [57] R. Vassar, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron, *Science* **1999**, 286, 735.
- [58] S. Sinha, J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, V. John, *Nature* **1999**, 402, 537.
- [59] R. Yan, M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl, D. B. Carter, A. G.

- Tomasselli, L. A. Parodi, R. L. Heinrikson, M. E. Gurney, *Nature* **1999**, 402, 533.
- [60] Q. Li, T. C. Sudhof, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 10542.
- [61] S. Kitazume, Y. Tachida, R. Oka, N. Kotani, K. Ogawa, M. Suzuki, N. Dohmae, K. Takio, T. C. Saido, Y. Hashimoto, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 14865.
- [62] S. F. Lichtenthaler, D. I. Dominguez, G. G. Westmeyer, K. Reiss, C. Haass, P. Saftig, B. De Strooper, B. Seed, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48713.
- [63] T. C. Sudhof, Q. Li, Fusion proteins with secretase cleavage specificity and therapeutic use for AD. US2005112696, **2005**.
- [64] M. Citron, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 92.
- [65] X. P. Shi, E. Chen, K. C. Yin, S. Na, V. M. Garsky, M. T. Lai, Y. M. Li, M. Platchek, R. B. Register, M. K. Sardana, M. J. Tang, J. Thiebeau, T. Wood, J. A. Shafer, S. J. Gardell, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10366.
- [66] B. D. Bennett, P. Denis, M. Haniu, D. B. Teplow, S. Kahn, J. C. Louis, M. Citron, R. Vassar, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 37712.
- [67] J. W. Creemers, D. Ines Dominguez, E. Plets, L. Serneels, N. A. Taylor, G. Multhaup, K. Craessaerts, W. Annaert, B. De Strooper, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 4211.
- [68] F. Fischer, M. Molinari, U. Bodendorf, P. Paganetti, *J. Neurochem.* **2002**, 80, 1079.
- [69] M. Willem, A. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. DeStrooper, P. Saftig, C. Birchmeier, C. Haass, *Science* **2006**, 314, 664.
- [70] F. Acquati, M. Accarino, C. Nucci, P. Fumagalli, L. Jovine, S. Ottolenghi, R. Taramelli, *FEBS Lett.* **2000**, 468, 59.
- [71] D. Andrau, C. Dumanchin-Njock, E. Ayril, J. Vizzavona, M. Farzan, M. Boisbrun, P. Fulcrand, J. F. Hernandez, J. Martinez, S. Lefranc-Jullien, F. Checler, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 25859.
- [72] G. G. Westmeyer, M. Willem, S. F. Lichtenthaler, G. Lurman, G. Multhaup, I. Assfalg-Machleidt, K. Reiss, P. Saftig, C. Haass, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 53205.
- [73] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price, P. C. Wong, *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, 233.
- [74] Y. Luo, B. Bolon, S. Kahn, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J. C. Louis, Q. Yan, W. G. Richards, M. Citron, R. Vassar, *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, 231.
- [75] M. Ohno, E. A. Sametsky, L. H. Younkin, H. Oakley, S. G. Younkin, M. Citron, R. Vassar, J. F. Disterhoft, *Neuron* **2004**, 41, 27.
- [76] E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, 247, 954.
- [77] M. E. Kennedy, W. Wang, L. Song, J. Lee, L. Zhang, G. Wong, L. Wang, E. Parker, *Anal. Biochem.* **2003**, 319, 49.
- [78] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A. K. Ghosh, X. C. Zhang, J. Tang, *Science* **2000**, 290, 150.
- [79] R. T. Turner, 3rd, G. Koelsch, L. Hong, P. Castanheira, J. Ermolieff, A. K. Ghosh, J. Tang, *Biochemistry* **2001**, 40, 10001.
- [80] B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 377.
- [81] D. R. Borchelt, G. Thinakaran, C. B. Eckman, M. K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C. M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, H. H. Slunt, R. Wang,

- M. Seeger, A. I. Levey, S. E. Gandy, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Price, S. G. Younkin, S. S. Sisodia, *Neuron* **1996**, 17, 1005.
- [82] M. Citron, D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George-Hyslop, D. J. Selkoe, *Nat. Med.* **1997**, 3, 67.
- [83] K. Duff, C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C. M. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M. N. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, S. Younkin, *Nature* **1996**, 383, 710.
- [84] D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, S. Younkin, *Nat. Med.* **1996**, 2, 864.
- [85] H. Laudon, E. M. Hansson, K. Melen, A. Bergman, M. R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, J. Naslund, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35352.
- [86] M. S. Wolfe, W. Xia, C. L. Moore, D. D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I. O. Donkor, D. J. Selkoe, *Biochemistry* **1999**, 38, 4720.
- [87] M. S. Wolfe, W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly, D. J. Selkoe, *Nature* **1999**, 398, 513.
- [88] C. Goutte, M. Tsunozaki, V. A. Hale, J. R. Priess, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 775.
- [89] G. Yu, M. Nishimura, S. Arawaka, D. Levitan, L. Zhang, A. Tandon, Y. Q. Song, E. Rogaeva, F. Chen, T. Kawarai, A. Supala, L. Levesque, H. Yu, D. S. Yang, E. Holmes, P. Milman, Y. Liang, D. M. Zhang, D. H. Xu, C. Sato, E. Rogaev, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebersold, L. S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser, P. St George-Hyslop, *Nature* **2000**, 407, 48.
- [90] R. Francis, G. McGrath, J. Zhang, D. A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M. C. Ellis, A. L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R. L. Myers, C. S. Himes, R. Hiesch, C. Ruble, J. S. Nye, D. Curtis, *Dev. Cell* **2002**, 3, 85.
- [91] S. F. Lee, S. Shah, H. Li, C. Yu, W. Han, G. Yu, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 45013.
- [92] C. Haass, *Embo J.* **2004**, 23, 483.
- [93] M. P. Mattson, *Nature* **2003**, 422, 385.
- [94] B. De Strooper, *Neuron* **2003**, 38, 9.
- [95] R. Kopan, M. X. Ilagan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 499.
- [96] D. M. Barten, V. L. Guss, J. A. Corsa, A. Loo, S. B. Hansel, M. Zheng, B. Munoz, K. Srinivasan, B. Wang, B. J. Robertson, C. T. Polson, J. Wang, S. B. Roberts, J. P. Hendrick, J. J. Anderson, J. K. Loy, R. Denton, T. A. Verdoorn, D. W. Smith, K. M. Felsenstein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 312, 635.
- [97] A. J. Nadin, G. I. Stevenson, Preparation of peptides as γ -secretase inhibitors. WO2001077144, **2001**.
- [98] M. S. Shearman, D. Beher, E. E. Clarke, H. D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A. L. Smith, G. Stevenson, J. L. Castro, *Biochemistry* **2000**, 39, 8698.
- [99] C. L. Moore, D. D. Leatherwood, T. S. Diehl, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3434.
- [100] M. S. Wolfe, *J. Mol. Neurosci.* **2001**, 17, 199.
- [101] W. A. Campbell, M. K. Iskandar, M. L. Reed, W. Xia, *Biochemistry* **2002**, 41, 3372.

- [102] A. Petit, F. Bihel, C. Alves da Costa, O. Pourquie, F. Checler, J. L. Kraus, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 507.
- [103] L. Zhang, L. Song, G. Terracina, Y. Liu, B. Pramanik, E. Parker, *Biochemistry* **2001**, 40, 5049.
- [104] O. Berezovska, C. Jack, P. McLean, J. C. Aster, C. Hicks, W. Xia, M. S. Wolfe, W. T. Kimberly, G. Weinmaster, D. J. Selkoe, B. T. Hyman, *J. Neurochem.* **2000**, 75, 583.
- [105] H. F. Dovey, V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztynska, K. L. Hu, K. L. Johnson-Wood, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. A. Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. C. Clemens, D. L. Czilli, D. K. Dieckman-McGinty, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. A. Hyslop, E. M. Johnstone, W. Y. Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, J. E. Audia, *J. Neurochem.* **2001**, 76, 173.
- [106] J. E. Audia, T. C. Britton, J. J. Droste, B. K. Folmer, G. W. Huffman, V. John, L. H. Latimer, T. E. Mabry, J. S. Nissen, W. J. Porter, J. K. Reel, E. D. Thorsett, J. S. Tung, C. N. Eid, W. L. Scott, Preparation of N-(phenylacetyl)di- and tripeptide derivatives for inhibiting β -amyloid peptide release. WO9822494, **1998**.
- [107] T. A. Lanz, C. S. Himes, G. Pallante, L. Adams, S. Yamazaki, B. Amore, K. M. Merchant, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 305, 864.
- [108] A. Geling, H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif, C. Haass, *EMBO Rep.* **2002**, 3, 688.
- [109] B. K. Hadland, N. R. Manley, D. Su, G. D. Longmore, C. L. Moore, M. S. Wolfe, E. H. Schroeter, R. Kopan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 7487.
- [110] T. A. Lanz, J. D. Hosley, W. J. Adams, K. M. Merchant, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 309, 49.
- [111] G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins, E. M. Parker, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 12876.
- [112] D. Seiffert, J. D. Bradley, C. M. Rominger, D. H. Rominger, F. Yang, J. E. Meredith, Jr., Q. Wang, A. H. Roach, L. A. Thompson, S. M. Spitz, J. N. Higaki, S. R. Prakash, A. P. Combs, R. A. Copeland, S. P. Arneric, P. R. Hartig, D. W. Robertson, B. Cordell, A. M. Stern, R. E. Olson, R. Zaczek, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 34086.
- [113] N. Bodor, H. H. Farag, M. E. Brewster, 3rd, *Science* **1981**, 214, 1370.
- [114] N. Bodor, L. Prokai, W. M. Wu, H. Farag, S. Jonalagadda, M. Kawamura, J. Simpkins, *Science* **1992**, 257, 1698.
- [115] Y. Laras, G. Quelever, C. Garino, N. Pietrancosta, M. Sheha, F. Bihel, M. S. Wolfe, J. L. Kraus, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 612.
- [116] S. Cheng, D. D. Comer, L. Mao, G. P. Balow, D. Pleyntet, Aryl compounds and uses in modulationg amyloid β . WO20040514, **2004**.
- [117] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R. A. Crowther, *Neuron* **1989**, 3, 519.
- [118] S. Barghorn, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2002**, 41, 14885.
- [119] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, 116, 227.
- [120] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, 116, 207.
- [121] S. C. Papasozomenos, *Lab. Invest.* **1989**, 60, 375.

- [122] M. E. King, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 260.
- [123] P. Nacharaju, L. Ko, S. H. Yen, *J. Neurochem.* **1997**, 69, 1709.
- [124] E. S. Matsuo, R. W. Shin, M. L. Billingsley, A. van deVoorde, M. O'Connor, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Neuron* **1994**, 13, 989.
- [125] N. Shahani, R. Brandt, *Cell Mol Life Sci.* **2002**, 59, 1668.
- [126] A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, E. M. Mandelkow, *Biochemistry* **1999**, 38, 3549.
- [127] A. Abraha, N. Ghoshal, T. C. Gamblin, V. Cryns, R. W. Berry, J. Kuret, L. I. Binder, *J. Cell Sci.* **2000**, 113 Pt 21, 3737.
- [128] T. C. Gamblin, R. W. Berry, L. I. Binder, *Biochemistry* **2003**, 42, 15009.
- [129] T. Arendt, J. Stieler, A. M. Strijkstra, R. A. Hut, J. Rudiger, E. A. van der Zee, T. Harkany, M. Holzer, W. Hartig, *J. Neurosci.* **2003**, 23, 6972.
- [130] H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *J. Cell Biol.* **1992**, 118, 573.
- [131] O. Schweers, E. M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 8463.
- [132] P. Friedhoff, A. Schneider, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1998**, 37, 10223.
- [133] M. Perez, J. M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini, J. Avila, *J. Neurochem.* **1996**, 67, 1183.
- [134] M. Goedert, R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Hasegawa, M. J. Smith, R. A. Crowther, *Nature* **1996**, 383, 550.
- [135] T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *FEBS Lett.* **1996**, 399, 344.
- [136] D. M. Wilson, L. I. Binder, *Am. J. Pathol.* **1997**, 150, 2181.
- [137] M. E. King, V. Ahuja, L. I. Binder, J. Kuret, *Biochemistry* **1999**, 38, 14851.
- [138] M. Von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 5129.
- [139] M. von Bergen, S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48165.
- [140] S. Barghorn, Q. Zheng-Fischhofer, M. Ackmann, J. Biernat, M. von Bergen, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2000**, 39, 11714.
- [141] C. M. Wischik, M. Novak, H. C. Thogersen, P. C. Edwards, M. J. Runswick, R. Jakes, J. E. Walker, C. Milstein, M. Roth, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 4506.
- [142] M. Novak, J. Kabat, C. M. Wischik, *Embo J.* **1993**, 12, 365.
- [143] R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 2288.
- [144] M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, A. Hascher, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Cur. Alzheimer Res.* **2005**, 2, 219.
- [145] M. von Bergen, S. Barghorn, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 158.
- [146] G. Carmel, E. M. Mager, L. I. Binder, J. Kuret, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 32789.
- [147] G. A. Jicha, R. Bowser, I. G. Kazam, P. Davies, *J. Neurosci. Res.* **1997**, 48, 128.
- [148] R. Mena, P. C. Edwards, C. R. Harrington, E. B. Mukaetova-Ladinska, C. M. Wischik, *Acta Neuropathol.* **1996**, 91, 633.
- [149] E. M. Mandelkow, O. Schweers, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, B. Trinczek, E. Mandelkow, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, 777, 96.
- [150] J. Kuret, C. N. Chirita, E. E. Congdon, T. Kannanayakal, G. Li, M. Necula, H. Yin, Q. Zhong, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 167.

- [151] E. Braak, H. Braak, E. M. Mandelkow, *Acta Neuropathol.* **1994**, 87, 554.
- [152] N. Ghoshal, F. Garcia-Sierra, Y. Fu, L. A. Beckett, E. J. Mufson, J. Kuret, R. W. Berry, L. I. Binder, *J. Neurochem* **2001**, 77, 1372.
- [153] R. S. Jope, G. V. Johnson, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 95.
- [154] P. Cohen, M. Goedert, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 479.
- [155] A. S. Manoukian, J. R. Woodgett, *Adv. Cancer Res.* **2002**, 84, 203.
- [156] N. Kozlovsky, R. H. Belmaker, G. Agam, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, 12, 13.
- [157] D. P. Hanger, K. Hughes, J. R. Woodgett, J. P. Brion, B. H. Anderton, *Neurosci. Lett.* **1992**, 147, 58.
- [158] E. M. Mandelkow, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede, E. Mandelkow, *FEBS Lett.* **1992**, 314, 315.
- [159] S. Lovestone, C. H. Reynolds, D. Latimer, D. R. Davis, B. H. Anderton, J. M. Gallo, D. Hanger, S. Mulot, B. Marquardt, S. Stabel, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 1077.
- [160] B. R. Sperber, S. Leight, M. Goedert, V. M. Lee, *Neurosci. Lett.* **1995**, 197, 149.
- [161] F. R. Lucas, R. G. Goold, P. R. Gordon-Weeks, P. C. Salinas, *J. Cell Sci* **1998**, 111, 1351.
- [162] F. Hernandez, J. Borrell, C. Guaza, J. Avila, J. J. Lucas, *J. Neurochem.* **2002**, 83, 1529.
- [163] K. Spittaels, C. Van den Haute, J. Van Dorpe, H. Geerts, M. Mercken, K. Bruynseels, R. Lasrado, K. Vandezande, I. Laenen, T. Boon, J. van Lint, J. Vandenheede, D. Moechars, R. Loos, F. van Leuven, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 41340.
- [164] A. Takashima, M. Murayama, O. Murayama, T. Kohno, T. Honda, K. Yasutake, N. Nihonmatsu, M. Mercken, H. Yamaguchi, S. Sugihara, B. Wolozin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 9637.
- [165] F. Kirschenbaum, S. C. Hsu, B. Cordell, J. V. McCarthy, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 30701.
- [166] F. Kirschenbaum, S. C. Hsu, B. Cordell, J. V. McCarthy, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7366.
- [167] A. E. Aplin, G. M. Gibb, J. S. Jacobsen, J. M. Gallo, B. H. Anderton, *J. Neurochem.* **1996**, 67, 699.
- [168] E. Planel, X. Sun, A. Takashima, *Drug Dev. Res.* **2002**, 56, 491.
- [169] D. A. Butterfield, J. Drake, C. Pocernich, A. Castegna, *Trends Mol. Med.* **2001**, 7, 548.
- [170] M. A. Smith, P. L. Harris, L. M. Sayre, G. Perry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 9866.
- [171] D. Morgan, D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, G. W. Arendash, *Nature* **2000**, 408, 982.
- [172] M. P. Mattson, *Physiol. Rev.* **1997**, 77, 1081.
- [173] J. P. Blass, *J. Neurosci. Res.* **2001**, 66, 851.
- [174] J. C. Dodart, C. Mathis, K. R. Bales, S. M. Paul, A. Ungerer, *Neurosci. Lett.* **1999**, 277, 49.
- [175] M. Buchner, R. Huber, C. Sturchler-Pierrat, M. Staufenbiel, M. W. Riepe, *Neurosci.* **2002**, 114, 285.
- [176] K. Saito, J. S. Elce, J. E. Hamos, R. A. Nixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 2628.
- [177] M. P. Mattson, S. L. Chan, *Cell Calcium* **2003**, 34, 385.

- [178] Y. Le, W. Gong, H. L. Tiffany, A. Tumanov, S. Nedospasov, W. Shen, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, J. M. Wang, *J. Neurosci.* **2001**, 21, RC123.
- [179] A. Eckert, K. Schindowski, S. Leutner, C. Luckhaus, N. Touchet, C. Czech, W. E. Müller, *Neurobiol. Dis.* **2001**, 8, 331.
- [180] M. P. Mattson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 120.
- [181] A. Eckert, U. Keil, C. A. Marques, A. Bonert, C. Frey, K. Schüssel, W. E. Müller, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 1627.
- [182] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
- [183] D. E. Koshland, Jr., *Sci. Am.* **1973**, 229, 52.
- [184] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1996**, 35, 2588.
- [185] H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2002**, 41, 2644.
- [186] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099.
- [187] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1648.
- [188] A. M. Davis, S. J. Teague, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1999**, 38, 736.
- [189] G. C. M. Pimentel, A. L., *The hydrogen bond*, Freeman, **1960**.
- [190] G. A. Jeffrey, Editor, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, **1997**.
- [191] G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 212.
- [192] J. Antosiewicz, J. A. McCammon, M. K. Gilson, *Biochemistry* **1996**, 35, 7819.
- [193] H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Princ. Met. Supramol. Chem.* **2000**.
- [194] C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 651.
- [195] D. G. Covell, A. Wallqvist, *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 281.
- [196] J. Israelachvili, H. Wennerstrom, *Nature* **1996**, 379, 219.
- [197] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chemie* **1993**, 105, 1610.
- [198] K. A. T. Silverstein, A. D. J. Haymet, K. A. Dill, *J. A. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3166.
- [199] G. K. H.-J. Böhm, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, **1996**.
- [200] T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Angew. Chemie* **1994**, 106, 2162.
- [201] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Accounts Chem. Res.* **1996**, 29, 144.
- [202] R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2000**, 4, 445.
- [203] D. Gorse, A. Rees, M. Kaczorek, R. Lahana, *Drug Disc. Today* **1999**, 4, 257.
- [204] W. A. Warr, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1997**, 37, 134.
- [205] D. E. Clark, S. D. Pickett, *Drug Discov. Today* **2000**, 5, 49.
- [206] L. Blundell Tom, H. Jhoti, C. Abell, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 45.
- [207] D. E. Clark, C. W. Murray, J. Li, *Rev. Comp. Chem.* **1997**, 11, 67.
- [208] E. Schroeder, C. Rufer, *Man. Tech. Pharm. Ind., Vol. 4: Pharmaceutical Chemistry*, **1982**.
- [209] L. Xing, C. Glen Robert, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **2002**, 42, 796.
- [210] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, 23, 3.
- [211] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, 46, 3.
- [212] S. Lovestone, C. L. Hartley, J. Pearce, B. H. Anderton, *Neurosci.* **1996**, 73, 1145.
- [213] R. Li, K. Lindholm, L.-B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, Y. Shen, *Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 3632.
- [214] S. Thaisrivongs, J. W. Strohbach, *Biopolymers* **1999**, 51, 51.

- [215] N. A. M. Yehia, W. Antuch, B. Beck, S. Hess, V. Schauer-Vukasinovic, M. Almstetter, P. Furer, E. Herdtweck, A. Dömling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3121.
- [216] A. Mittra, M. Yamashita, I. Kawasaki, H. Murai, T. Yoshioka, S. Ohta, *Synlett* **1997**, 909.
- [217] J. V. N. V. Prasad, A. Pavlovsky, K. S. Para, E. L. Ellsworth, P. J. Tummino, C. Nouhan, D. Ferguson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1133.
- [218] S. V. Ley, M. L. Trudell, D. J. Wadsworth, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8285.
- [219] C. L. Zhang, S. S. Chatterjee, U. Stein, U. Heinemann, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1992**, *345*, 85.
- [220] F. R. Foden, J. McCormick, D. M. O'Mant, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 199.
- [221] A. Dal Pozzo, A. Dansi, E. Meneghini, *Boll. Chim. Farm.* **1974**, *113*, 280.
- [222] G. Hata, H. Kawai, T. Kaneko, T. Imaoka, Y. Kitano, M. Mutoh, H. Imanishi, *Chem. Lett.* **1993**, 529.
- [223] T. Godel, H. Hilpert, R. Humm, M. Rogers-Evans, D. Rombach, C. M. Stahl, P. Weiss, W. Wostl, Preparation of tetronic and tetramic acids as β -secretase inhibitors. US2005119329, **2005**.
- [224] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3216.
- [225] Z. Liu, X. Ruan, X. Huang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2505.
- [226] T. T. Romoff, L. Ma, Y. Wang, D. A. Campbell, *Synlett* **1998**, 1341.
- [227] K.-H. Park, M. J. Kurth, *Drugs of the Future* **2000**, *25*, 1265.
- [228] J. Matthews, R. A. Rivero, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4808.
- [229] D. M. Fitch, K. A. Evans, D. Chai, K. J. Duffy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5521.
- [230] B. A. Kulkarni, A. Ganesan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4369.
- [231] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6147.
- [232] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- [233] T. Doi, I. Hijikuro, T. Takahashi, *Synlett* **1999**, 1751.
- [234] J. Coste, M. N. Dufour, A. Pantaloni, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 669.
- [235] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1967.
- [236] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Vol. 3. Auflage, **2004**.
- [237] F. Gruninger-Leitch, D. Schlatter, E. Kung, P. Nelbock, H. Dobeli, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4687.
- [238] M. Brockhaus, H. Doebeli, F. Grueninger, P. Huguenin, E. A. Kitas, P. Nelboeck-Hochstetter, US2003125257, **2003**.
- [239] D. J. Selkoe, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 1375.
- [240] M. Citron, *Neurobiol. Aging* **2002**, *23*, 1017.
- [241] S. Roggo, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 359.
- [242] R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, *Nature* **1995**, *375*, 754.
- [243] B. De Strooper, P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, F. van Leuven, *Nature* **1998**, *391*, 387.
- [244] A. Herreman, L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, B. De Strooper, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 461.
- [245] Z. Zhang, P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, B. A. Yankner, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 463.
- [246] H. Steiner, M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M. L. Grim, R. Baumeister, K. Fichteler, C. Haass, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 848.

- [247] C. Haass, H. Steiner, *Trends Cell Biol.* **2002**, 12, 556.
- [248] G. Clayden, Warren and Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**.
- [249] L. Jiang, A. Davison, G. Tennant, R. Ramage, *Tetrahedron* **1998**, 54, 14233.
- [250] N. Takamura, T. Mizoguchi, K. Koga, S. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 4495.
- [251] M. P. Doyle, A. V. Kalinin, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2179.
- [252] R. Angell, M. G. B. Drew, M. Fengler-Veith, H. Finch, L. M. Harwood, A. W. Jahans, T. T. Tucker, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3107.
- [253] A. Y. Kornilova, C. Das, M. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 16470.
- [254] I. Pinnix, U. Musunuru, H. Tun, A. Sridharan, T. Golde, C. Eckman, C. Ziani-Cherif, L. Onstead, K. Sambamurti, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 481.
- [255] M. S. Wolfe, *Biochemistry* **2006**, 45, 7931.
- [256] Y. Gu, F. Chen, N. Sanjo, T. Kawarai, H. Hasegawa, M. Duthie, W. Li, X. Ruan, A. Luter, H. T. Mount, A. Tandon, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop, *J. Biol. Chem.* **2002**, 278, 7374.
- [257] N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, T. Iwatsubo, *Nature* **2003**, 422, 438.
- [258] M. J. LaVoie, P. C. Fraering, B. L. Ostaszewski, W. Ye, W. T. Kimberly, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 37213.
- [259] A. Capell, D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M. S. Shearman, C. Haass, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6471.
- [260] M. S. Wolfe, J. De Los Angeles, D. D. Müller, W. Xia, D. J. Selkoe, *Biochemistry* **1999**, 38, 11223.
- [261] V. K. Lazarov, P. C. Fraering, W. Ye, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, M. Li, *Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 6889.
- [262] P. Cohen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 309.
- [263] M. E. Noble, J. A. Endicott, L. N. Johnson, *Science* **2004**, 303, 1800.
- [264] C. J. Phiel, C. A. Wilson, V. M. Lee, P. S. Klein, *Nature* **2003**, 423, 435.
- [265] C. Feyt, P. Kienlen-Campard, K. Leroy, F. N'Kuli, P. J. Courtoy, J. P. Brion, J. N. Octave, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 33220.
- [266] L. Meijer, M. Flajolet, P. Greengard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 471.
- [267] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormo, Y. Nilsson, A. C. Radesater, E. Jerling, P. O. Markgren, T. Borgegard, M. Nylof, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Diaz-Nido, J. Avila, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45937.
- [268] S. Weggen, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, C. U. Pietrzik, V. Ozols, A. Fauq, T. E. Golde, E. H. Koo, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 31831.
- [269] T. Vandebroek, T. Vanhelmont, D. Terwel, P. Borghgraef, K. Lemaire, J. Snauwaert, S. Wera, F. Van Leuven, J. Winderickx, *Biochemistry* **2005**, 44, 11466.
- [270] D. Huang, U. Luethi, P. Kolb, K. Edler, M. Cecchini, S. Audetat, A. Barberis, A. Caflisch, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5108.
- [271] C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg, L. A. Mitscher, *Pure and Applied Chem.* **1998**, 70, 1129.
- [272] G. Schneider, U. Fechner, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2005**, 4, 649.
- [273] S. Renner, T. Noeske, C. G. Parsons, P. Schneider, T. Weil, G. Schneider, *ChemBioChem* **2005**, 6, 620.
- [274] M. Krovat Eva, T. Langer, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 716.
- [275] E. A. Hecker, C. Duraiswami, T. A. Andrea, D. J. Diller, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **2002**, 42, 1204.

- [276] Catalyst:, <http://www.accelrys.com/doc/life/catalyst410/tutorials>.
- [277] P. Rademacher, *Physical Organic Chemistry, Vol 2: Structures of Organic Molecules*, **1987**.
- [278] A. K. Ghose, G. M. Crippen, G. R. Revankar, P. A. McKernan, D. F. Smee, R. K. Robins, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 746.
- [279] M. Lipton, W. C. Still, *J. Comp. Chem.* **1988**, 9, 343.
- [280] R. A. Dammkoehler, S. F. Karasek, E. F. B. Shands, G. R. Marshall, *J. Comp.Aid. Mol. Des.* **1989**, 3, 3.
- [281] T. F. H. G. M. Crippen, *Distance Geometry and Molecular Conformations*, Research Studies Press, Ltd. John Wiley & Sons, **1988**.
- [282] S. C. H. J. A. McCammon, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1987**.
- [283] N. Go, H. A. Scheraga, *Macromolecules* **1978**, 11, 552.
- [284] A. Smellie, S. L. Teig, P. Towbin, *J. Comp. Chem.* **1995**, 16, 171.
- [285] A. Smellie, S. D. Kahn, S. L. Teig, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1995**, 35, 285.
- [286] A. Smellie, S. D. Kahn, S. L. Teig, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1995**, 35, 295.
- [287] T. W. Schultz, T. I. Netzeva, D. W. Roberts, M. T. D. Cronin, *Chem. Res. Tox.* **2005**, 18, 330.
- [288] G. Verdile, S. Fuller, C. S. Atwood, S. M. Laws, S. E. Gandy, R. N. Martins, *Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 397.
- [289] H. Braak, E. Braak, *Neurobiol. Aging* **1994**, 15, 355.
- [290] J. Lewis, D. W. Dickson, W. L. Lin, L. Chisholm, A. Corral, G. Jones, S. H. Yen, N. Sahara, L. Skipper, D. Yager, C. Eckman, J. Hardy, M. Hutton, E. McGowan, *Science* **2001**, 293, 1487.
- [291] N. D. Kimpe, Verhe, R., in *Chemistry of Functional Groups*, John Wiley & Sons, **1988**, pp. 1.
- [292] Z. Diwu, C. Beachdel, D. H. Klaubert, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4987.
- [293] C. L. Lee, Y. Lam, S. Y. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 109.
- [294] D. W. Hein, R. J. Alheim, J. J. Leavitt, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 427.
- [295] A. Brembilla, D. Roizard, P. Lochon, *Syn. Comm.* **1990**, 20, 3379.
- [296] R. H. Tale, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1641.
- [297] D.-F. Shi, T. D. Bradshaw, S. Wrigley, C. J. McCall, P. Lelieveld, I. Fichtner, M. F. G. Stevens, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3375.
- [298] M. S. Wolfe, *Spektrum der Wissenschaft* **2006**, 28.
- [299] T. E. L. F. Tietze, *Reaktionen und Synthesen*, Wiley-VCH, **2006**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Gregor Larbig
Anschrift: Hauptstr. 13
63571 Gelnhausen-Höchst
Geburtsdatum: 31. Oktober 1975
Geburtsort: Hanau

Ausbildung

Apr. 03 - Juli 2006 Doktorarbeit: „Studien zur Identifizierung und Optimierung potentieller Wirkstoffe für die Behandlung von Morbus Alzheimer“; Arbeitsgruppe Prof. Dr. Boris Schmidt, Technische Universität zu Darmstadt

Mai 2002 Teil B der Hauptprüfung über die Befähigung als staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Apr. 2001 Teil A der Hauptprüfung über die Befähigung als staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Aug. – Nov. 2000 Wissenschaftliche Arbeit im Rahmen des 4. Semesters im Hauptstudium der Lebensmittelchemie: „Untersuchung des ätherischen Öls von *Sideritis syriaca*“ und Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl in unterschiedlichen *Solidago canadensis* Pflanzen – Optimierung einer Methode zur Isolierung der Hauptkomponente Germacren D“; Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Mosandl, Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

März 1999	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Okt. 1996	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
Aug. 95 – Sept. 1996	Zivildienst als Betreuer von pflegebedürftigen Kindern und Jugendlichen
Juni 1995	Abitur am Grimmelshausen Gymnasium Gelnhausen

Berufs- und Auslandsaufenthalte

Seit Juli 2006	Post-Doc bei Merck KGaA Darmstadt in der Abteilung Business Development/Advanced Materials
Apr. 03 – Juli 2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Hochschule zu Darmstadt
Juli – Sept. 2004	Forschungsaufenthalt am Trinity College Dublin, Irland, Molecular Design Group Dr. David G. Lloyd
Sept. 02 – Feb. 2003	Praktikum bei Merck KGaA Darmstadt in der Abteilung Medizinische Chemie/Onkologie unter der Betreuung von Dr. Ulrich Emde und Dr. Michael Arlt
Nov. 01 - Apr. 2002	Praktikum am Staatlichen Untersuchungsamt Hessen, Standort Kassel in der staatlichen Lebensmittelüberwachung
Mai – Okt. 2001	Praktikum bei Morphochem AG in München im Bereich medizinal – chemischer Forschung unter der Betreuung von Dr. Alexander Dömling

Veröffentlichungen

- G. Larbig, M. Pickhardt, D. G. Lloyd, B. Schmidt, E. Mandelkow "Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: A ligand based approach results in succesful scaffold hopping" *Curr. Alz. Research* **2007**, *im Druck*
- A. Dömling, B. Beck, W. Baumbach, G. Larbig "Towards erythropoietin mimicking small molecules" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 2, 379 - 384.
- **EP Appl. 2006**, Anmeldung 5.11.2006 B. Schmidt, G. Larbig, D. G. Lloyd, M. Pickhardt, E. Mandelkow.
- G. Larbig, B. Schmidt "A facile synthesis of tetramic and tetronic acids as β -Secretase inhibitors" *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 480-490.
- B. Schmidt, S. Baumann, R. Narlawar, H. A. Braun, G. Larbig "Modulators & Inhibitors of β - and γ - Secretase" *Neurodegen. Dis.* **2006**, 3, 290 - 297.
- B. Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig "Inhibitors and Modulators for β - and γ - Secretase" *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6(4), 377-392.
- B. Schmidt, G. Larbig "Book Review: Classics in Total Synthesis II: More Targets, Strategies Methods by K. C. Nicolaou and S. A. Snyder" *ChemBioChem.* **2004**, 5, 885.
- G. Larbig, A. Zall, B. Schmidt "Inhibitors designed for Presenilin 1 by means of aspartic acid activation" *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 2334-2340.
- B. Beck, G. Larbig, B. Mejat, M. Magnin-Lachaux, A. Picard, E. Herdtweck, A. Dömling "Short and diverse route toward complex natural product-like macrocycles" *Org. Lett.* **2003**, 5, 1047.

Gregor Larbig
Hauptstr. 13

23.02.2007

63571 Gelnhausen

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Gregor Larbig
Hauptstr. 13

23.02.2007

63571 Gelnhausen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.